

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99814388. X

[51] Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 8 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1330666C

[22] 申请日 1999.11.11 [21] 申请号 99814388. X

[30] 优先权

[32] 1998.11.13 [33] SE [31] 9803891 - 2

[86] 国际申请 PCT/SE1999/002053 1999.11.11

[87] 国际公布 WO2000/029437 英 2000.5.25

[85] 进入国家阶段日期 2001.6.12

[73] 专利权人 血管遗传瑞典股份公司

地址 瑞典哥德堡

[72] 发明人 A·伯肯斯塔姆 L·波尔林格

[56] 参考文献

WO9639426A1 1996.12.12

审查员 陈中伟

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 周中琦

权利要求书 2 页 说明书 61 页 附图 14 页

[54] 发明名称

低氧-诱导因子 1 α HIF-1 α 变体和鉴定 HIF-1 α 调节剂的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种鉴定能调节人 HIF-1 α 的功能域的功能的化合物的方法, 所述方法包括: (i) 使候选化合物与一种人 HIF-1 α 的变体接触, 所述变体基本上没有人 HIF-1 α 的至少一个功能域, 或者具有使人 HIF-1 α 的至少一个功能域基本上失活的一个突变, 所述一个或多个功能域选自: (a) 位于人 HIF-1 α 的 178 和 390 位氨基酸之间的 PAS-B 结构域, (b) 基本上位于人 HIF-1 α 的 718 至 721 位氨基酸的 C-末端核定位序列 (NLS), 和 (c) 基本上位于人 HIF-1 α 的 531 和 584 位氨基酸之间的反式激活蛋白/辅激活蛋白结构域 (N-TAD), 和 (d) 基本上位于人 HIF-1 α 的 813 和 826 位氨基酸之间的反式激活/辅激活蛋白结构域 (C-TAD), 和 (ii) 测定候选化合物对所述变体的作用。

1. 一种鉴定能调节人HIF-1 α 的功能域的功能的化合物的方法, 所述方法包括:

(i) 使候选化合物与表达一种人HIF-1 α 的变体的细胞接触, 所述变体与一个分子探针结合, 所述变体没有人HIF-1 α 的至少一个功能域, 或者具有使人HIF-1 α 的至少一个功能域失活的一种突变, 所述一个或多个功能域选自:

(a) 位于人HIF-1 α 的178和390位氨基酸之间的PAS-B 结构域,

(b) 位于人HIF-1 α 的718至721位氨基酸的 C-末端核定位序列NLS, 和

(c) 位于人HIF-1 α 的531和584位氨基酸之间的反式激活蛋白结构域N-TAD, 和

(d) 位于人HIF-1 α 的813和826位氨基酸之间的反式激活蛋白结构域C-TAD, 和

(ii) 检测所述分子探针在细胞中的定位, 定位的变化是能调节所述功能域的功能的化合物的指征。

2. 根据权利要求1的方法, 其中所述人HIF-1 α 的功能域是C-末端核定位序列NLS结构域。

3. 根据权利要求1或2的方法, 其中所述分子探针是一种荧光探针, 其中细胞核对细胞质的相对荧光变化是能调节所述功能域的功能的一种化合物的指征。

4. 根据权利要求3的方法, 其中所述分子探针是阿昆拉维多利亚绿荧光蛋白。

5. 一种鉴定能调节位于人HIF-1 α 的718至721位氨基酸的 C-末端核定位序列NLS的功能的化合物的方法, 包括

(i) 使候选化合物与表达人HIF-1 α 的变体的细胞接触, 所述变体缺失所述NLS, 或者具有使所述NLS失活的一种突变, 和

(ii) 检测所述候选化合物对所述变体的作用。

6. 根据权利要求5的方法,其中所述人HIF-1 α 的变体调节报道基因的活性;该报道基因的活性改变是能调节所述NLS的功能的化合物的指征。

7. 根据权利要求6的方法,其中所述人HIF-1 α 的变体与GAL4的DNA结合域融合,并且其中所述细胞含有与报道基因操作地连接的GAL4效应元件。

8. 根据权利要求7的方法,其中所述人HIF-1 α 的变体与阿昆拉维多利亚绿荧光蛋白融合,并且其中所述细胞含有与报道基因操作地连接的红细胞生成素低氧效应元件。

9. 根据权利要求7或8的方法,其中所述报道基因是萤火虫荧光素酶基因。

10. 根据权利要求5的方法,在转录辅激活蛋白的存在下进行所述方法。

11. 根据权利要求10的方法,其中所述转录辅激活蛋白选自SRC-1, TIF2 和 CBP。

12. 根据权利要求11的方法,在氧化还原调节蛋白Ref-1的存在下进行。

低氧-诱导因子1 α HIF-1 α 变体和鉴定 HIF-1 α 调节剂的方法

技术领域

本发明涉及人低氧-诱导因子(HIF) -1 α 的新的变体, 以及涉及所述变体在对于HIF-1 α 中功能基元的阐明的筛选测定中和对于调节HIF-1 α 的功能的化合物的鉴定中的用途, 所述化合物有潜力地用于正常情况下与HIF-1 α 相关的的靶基因的调节, 所述基因是例如血管生成, 红细胞生成和糖酵解涉及的基因。

背景技术

氧在脊椎动物细胞的线粒体中作为最终的电子受体起着关键的生物学作用。在进化中, 这些细胞发育出感觉氧水平的变化的方法, 在该过程中, 获得了对包括血管生成, 红细胞生成和糖酵解的缺氧症的适应的生理学响应所涉及的基因表达有条件性地调节的能力。这些基因包括血管内皮生长因子, 血红细胞生成素, 几种糖酵解酶和可诱导氧化氮合酶, 并且都表现出包含低氧效应元件(HRES) (有关综述, 参见 Guillemin 和Krasnow (1997), 细胞 (Cell) 89, 9-12; Wenger 和 Gassmann (1997) 生物化学(Biol. Chem.) 378, 609-616) 。 在低氧条件下, 由低氧-诱导因子(HIF) -1 α 和Arnt组成的杂二聚体复合物识别这些效应元件 (Wang 等. (1995) 美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 92, 5510-5514; Gradin等, (1996) 分子细胞生物学(Mol. Cell. Biol.) 16, 5221-5231)。这两个转录因子属于快速生长的碱性-螺旋-环-螺旋(bHLH)-PAS (Eier, Arnt, Sim) 蛋白质家族。 bHLH/PAS 转录因子起着多样生物学作用。

最近产生出的HIF- 1 α - 和Arnt-缺陷胚胎干细胞和小鼠证明了

这两个因子在心血管发育和HRE-驱动的靶基因的调控中的关键作用 (Maltepe 等 (1997) 自然(Nature)386, 403-407)。近来难以理解的是HIF-1 α -Arnt 复合物的低氧依赖性形成和激活的机理。本发明人和同事最近证明HIF-1 α 蛋白质水平如果不是在所有的细胞中那就是在大多数细胞中在低氧条件下特异性大量地被正调节。因为HIF-1 α mRNA水平响应低氧而没有变化, 则该调节模式看起来通过涉及HIF-1 α 蛋白质水平的稳定化作用的转录后步骤而发生 (Huang 等(1996) 生物化学杂志(J. Biol. Chem.)271, 32253-32259; Kallio等(1997) 美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 94, 5667-5672; Salceda 和 Caro (1997) 生物化学杂志(J. Biol. Chem.)272, 22642-22647), 在前积聚Arnt并且产生细胞核 DNA结合复合物。

转录因子进入细胞核常常是一个有条件的控制过程, 其响应各种外部和内部刺激和响应发育提示而发生 (Vandromme等 (1996) 生物化学科学动向(Trends Biochem. Sci.)21, 59-64)。因此, 该过程可以构成调节转录因子活性的关键机理。蛋白质向细胞核的活性的依赖能量的传输需要被传送的蛋白质(或者其相互作用的配偶体)中存在一个或几个细胞核定位信号 (NLSS)。NLS 基元是短的氨基酸部分, 其可以主要分为两个组: (i) SV40 大 T 抗原型NLS, 特征在于四个或多个保守碱性残基的一个单一的簇; 和 (ii) 由两部分组成的NLS, 由两个碱性残基组成, 一个是任何十个氨基酸的间隔区, 一个是接下来的5个残基中的三个是碱性的碱性簇 (Vandromme等, 上文, 和其中的参考)。

Wang 等 (1995), 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 92, 5510-5514和W096/39426中公开了纯化的HIF-1 α , 其氨基酸序列和多核苷酸序列。有人提出 (Jiang 等 (1997) 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)272, 19253-19260) HIF-1 α 的531-826位氨基酸包含两个反式激活域, TAD-N (531-575位氨基酸) 和 TAD-C (786-826位氨基酸)。此外, Pugh 等 ((1997) 生物化学杂志 (J. Biol.

Chem.) 272, 1120511214) 定义了HIF-1 α 中两个最小结构域(549-582为和775-826位氨基酸), 它们各自对转录激活起作用。

需要人HIF-1 α 的新的变体, 该变体可以用于对于HIF-1 α 中功能基元的阐明的筛选测定中和对于调节HIF-1 α 的功能的化合物的鉴定中, 所述化合物有潜力地用于正常情况下与HIF-1 α 相关的靶基因的调节, 所述基因是例如血管生成, 红细胞生成和糖酵解涉及的基因。

发明内容

出人意料地证明HIF-1 α 的激活机理是一个多步骤过程, 包括低氧-依赖性核输入和反式激活结构域的激活(脱抑制), 导致CBP/p300 辅激活蛋白的募集。证明可诱导核积聚取决于也携带低氧-诱导反式激活结构域的HIF-1 α 的C-末端中的核定位信号(NLS)。NLS序列基元中缺失或者单个氨基酸取代都抑制HIF-1 α 的核输入, 并且在全长蛋白质中, 这些突变也导致HIF-1 α 的反式激活活性的抑制和CBP的募集。进一步证明核定位本身不足以反式激活, 因为HIF-1 α 与异源GAL4 DNA 结合域的融合产生一种蛋白质, 该蛋白质表现出组成型核定位并且对于作为CBP-依赖性转录因子需要低氧刺激。

此外, 转录辅激活蛋白SRC-1 和TIF2也支持HIF-1 α -依赖性转录激活。CBP和 SRC-1/TIF2 类辅激活蛋白瞄向HIF-1 α 的N- 和 C-末端反式激活结构域, 并且通过氧化还原调节酶Ref-1 增强其功能。事实上, 在低氧条件下 Ref-1与 HIF-1 α 发生物理作用。因此, 反式激活辅激活蛋白CBP和 SRC-1/TIF2的Ref-1-依赖性募集引起的低氧-诱导核输入和反式激活可以被功能性相互分开, 并且在HIF-1 α 引起的信号转导中起着关键作用。

因此, 本发明第一个方面涉及一种鉴定能调节人HIF-1 α 的功能域的功能的化合物的方法, 所述方法包括:

(i) 使候选化合物与一种人HIF-1 α 的变体接触, 所述变体基本上没有人HIF-1 α 的至少一个功能域, 或者具有使人HIF-1 α 的至少一个功能域基本上失活的一个突变, 所述一个或多个功能域选自:

(a) 位于人HIF-1 α 的178和390位氨基酸之间的PAS-B 结构域,

(b) 基本上位于人HIF-1 α 的718和721位氨基酸的 C-末端核定位序列

(NLS), 和

(c)基本上位于人HIF-1 α 的531和584位氨基酸之间的反式激活蛋白结构域(transactivator domain)(N-TAD), 和

(d)基本上位于人HIF-1 α 的813和826位氨基酸之间的反式激活蛋白结构域(C-TAD), 和

(ii) 测定候选化合物对所述变体的作用。

在一个优选的方式中,所述方法包括(i)使一种候选化合物与表达所述人HIF-1 α 变体的细胞接触,所述变体与一个分子探针结合,和(ii)检测所述分子探针在该细胞中的定位。所述分子探针优选是一种荧光探针,例如,阿昆拉维多利亚(*Aequora Victoria*)绿荧光蛋白,或者其一种变体。细胞核对细胞质的相对荧光变化是一种能调节所述功能域的功能的化合物的指征。

在本发明另一个优选的方式中,所述人HIF-1 α 的变体调节报道基因的活性;该报道基因活性的变化是一种能调节所述功能域的功能的化合物的指征。该HIF-1 α 变体能例如与GAL4的DNA结构域融合,表达该HIF-1 α 变体的细胞含有与报道基因操作地连接的GAL4效应元件。或者,该人HIF-1 α 变体能与*Aequora Victoria*绿荧光蛋白融合,表达该HIF-1 α 变体的细胞适当地含有与报道基因(如萤火虫荧光素酶基因)操作地连接的促红细胞生成素低氧效应元件。

根据本发明的方法可以适当地在转录辅激活蛋白,特别是一个或多个称之为SRC-1, TIF2 或CBP的转录辅激活蛋白的存在下进行。当存在一个转录辅激活蛋白时,根据本发明的方法可以适当地在还存在称之为Ref-1的氧化还原调节蛋白下进行。

当所述人HIF-1 α 的功能域是PAS-B结构域时,所述人HIF-1 α 变体可以是例如HIF-1 α /1-74 (SEQ ID NO: 2); HIF-1 α /1-245 (SEQ ED NO: 3); HIF-1 α /Δ178-390 (SEQ DD NO: 6); HIF-1 α /331-641 (SEQ ID NO: 7); HIF-1 α /526-641 (SEQ ID NO: 8); HIF-1 α /526-813 (SEQ ID NO: 9); 或 HIF-1 α /526-826 (SEQ ID NO: 10)。

当所述人HIF-1 α 的功能域是C-末端核定位序列(NLS)结构域时,所述人HIF-1 α 变体可以是例如HIF-1 α /1-74 (SEQ BD NO: 2);

HIF-1 α /1-245 (SEQ ID NO: 3); HIF-1 α /1-330 (SEQ ID NO: 4); HIF-1 α /1-652 (SEQ ID NO: 5); HIF-1 α /331-641 (SEQ ID NO: 7); 或 HIF-1 α /526-641 (SEQ ID NO: 8)。

当所述人HIF-1 α 的功能域是基本上位于人HIF-1 α 的531至584位氨基酸之间的反式激活蛋白结构域 (N-TAD) 时, 所述人HIF-1 α 变体可以是例如HIF-1 α /1-74 (SEQ ID NO: 2); HIF-1 α /1-245 (SEQ ID NO: 3); HIF-1 α /1-330 (SEQ ID NO: 4); HIF-1 α /776-826 (SEQ ID NO: 14); 或 HIF-1 α /776-813 (SEQ ID NO: 15)。

当所述人HIF-1 α 的功能域是基本上位于人HIF-1 α 的813至826位氨基酸之间的反式激活蛋白结构域 (C-TAD) 时, 所述人HIF-1 α 变体可以是例如HIF-1 α /1-74 (SEQ ID NO: 2); HIF-1 α /1-245 (SEQ ID NO: 3); HIF-1 α /1-330 (SEQ ID NO: 4); HIF-1 α /1-652 (SEQ ID NO: 5); HIF-1 α /331-641 (SEQ ID NO: 7); HIF-1 α /526-641 (SEQ ID NO: 8); HIF-1 α /526-813 (SEQ ID NO: 9); HIF-1 α /1-813 (SEQ ID NO: 12); HIF-1 α /531-584 (SEQ ID NO: 13); HIF-1 α /776-813 (SEQ ID NO: 15)。

在另一方面, 本发明提供了一种分离的人HIF-1 α 变体, 所述变体选自HIF-1 α /1-74 (SEQ ID NO: 2); HIF-1 α /1-245 (SEQ ID NO: 3); HIF-1 α /1-330 (SEQ ID NO: 4); HIF-1 α /1-652 (SEQ ID NO: 5); HIF-1 α /178-390 (SEQ ID NO: 6); HIF-1 α /331-641 (SEQ ID NO: 7); HIF-1 α /526-641 (SEQ ID NO: 8); HIF-1 α /526-813 (SEQ ID NO: 9); HIF-1 α /526-826 (SEQ ID NO: 10); HIF-1 α /71-826 (SEQ ID NO: 11); HIF-1 α /1-813 (SEQ ID NO: 12); HIF-1 α /531-584 (SEQ ID NO: 13); HIF-1 α /776-826 (SEQ ID NO: 14); 和 HIF-1 α /776-813 (SEQ ID NO: 15)。

如图1所示测定了HIF-1 α 表现出诱导低氧核转位。用pCMV-HIF-1 α 瞬时转染COS7 细胞, 并且在表达24小时之后在用于免疫细胞化学固定之前在含氧量正常(21% O₂) 和含氧量低(1% O₂) 的条件下再温育6小时。通过间接免疫荧光法使用材料和方法中描述的抗-HIF-1 α 抗血清测定表达HIF-1 α 的位置。

如图2所示测定了GFP-HIF-1 α 对核转位的低氧调节。(A) 图示说

明GFP和 GFP- HIF-1 α 蛋白质结构。对于HIF-1 α , 也指出了碱性-螺旋-环-螺旋和PAS (Per/Arnt/Sim) 结构域的位置。(B) GFP- HIF-1 α 融合蛋白的低氧和低氧模拟的化学品诱导的快速核转位。用GFP或GFP-HIF-1 α 表达载体瞬时转染COS7 细胞, 并且在表达24小时之后用1% O₂, 100 μ M CoCl₂或者用100 μ M 2, 2' -联吡啶 (DP) 温育6小时, 然后用显微镜检测。(C) 低氧诱导正调节内源HIF-1 α , 而不是GFP-HIF-1 α , 蛋白质水平。用非融合的GFP 表达载体(泳道1和 2)或者用GFP- HIF-1 α (泳道3和 4) 转染COS7 细胞。转染后将细胞暴露给21% 或1% (低氧) 氧30分钟, 标记为- 和+ 符号。根据材料和方法所述制备全细胞提取物, 并且通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和使用抗-HIF-1 α 抗血清的免疫印迹分析50 μ g等份。GFP- HIF-1 α 蛋白质以箭头表示, 而星号指内源HIF-1 α 免疫反应性。左边指分子量标记物(kDa) 位置。(D) 时间依赖性GFP- HIF-1 α 的核转位。所A栏所示, 用GFP-HIF-1 α 表达载体转染COS7 细胞并且用100 μ M 2, 2' -联吡啶诱导。诱导后在指定的时间点照相。(E) 曲线代表GFP- HIF-1 α 的细胞核进入。用100 μ M 2, 2' -联吡啶诱导GFP- HIF-1 α 转染的细胞, 并且在固定的时间点对总的250 个细胞分析荧光分布。N (%) 是仅表示核荧光的细胞百分比。

如图3所示测定了低氧信号消除时HIF-1 α 的细胞核输出。(A) 实验策略大纲。用GFP- HIF-1 α 表达载体(6 μ g/60-mm 培养皿)转染COS7 细胞6小时, 并且在大气氧下培养12小时, 然后它们或者用100 μ M 2, 2' -联吡啶诱导或者保持不诱导1小时。接着通过更换培养基去除2, 2' -联吡啶并且洗涤细胞, 然后细胞在不存在(-)或存在(+)25 μ M 放线菌酮下温育 24 小时。在这期间, 在如箭头所示的不同的时间点用显微镜观察细胞。对于各个时间点, 计数并分析总共200 个细胞。(B) 去除2, 2' -联吡啶时HIF-1 α 从细胞核中再分布。显示在消除后各个时间点的GFP - HIF - 1 α 的亚细胞分布。指出属于各类的细胞的百分比(对于分类, 见表I)。也给出了用2, 2' -联吡啶诱导之前GFP- HIF-1 α 的细胞内分布作为参考。

如图4所示测定了GFP- HIF-1 α 融合蛋白的亚细胞分布。(A) 融合蛋白的图示。将所有的表达构建体组装成在CMV启动子控制下表达人

源化GFP的 pCMX-SAH/Y145F 载体。(B) GFP-HIF-1 α 融合蛋白的亚细胞分布。相应于A栏代表的那些的融合构建体被转染到 COS7 细胞中并且在表达24小时之后向培养基中加入100 μ M 2, 2'-联吡啶(DP)或赋形剂(H₂O), 并且在观察之前温育6小时。使用Zeiss荧光显微镜照相。

如图5所示测定了鉴定HIF-1 α 的C-末端中低氧-诱导NLS基元。(A) 分析人(h) 和小鼠(m) HIF-1 α 序列发现两个保守的核定位信号(NLS)基元。该 N-末端 NLS基元表现出与如X-光滑核质蛋白所例示的二分之一样NLS序列的同源性, 而C-末端NLS基元与 SV40大 T抗原-样 NLS序列相关。(B) NLS基元中的点诱变对GFP-HIF-1 α 融合蛋白在细胞核中的积聚的影响。用携带野生型或突变的HIF-1 α NLS序列的各种GFP-HIF-1 α 融合蛋白表达质粒转染COS7细胞。所述突变分别是在残基17和18处一个(Arg变为Ala)或者两个(Arg变为Gly)氨基酸变化, 或者是在密码子719处的一个氨基酸变化(Lys变为Thr)。转染后, 在荧光显微镜观察之前用100 μ M 2, 2'-联吡啶或只用赋形剂将细胞处理6小时。

如图6所示测定了重叠的C-末端结构介导通过HIF-1 α 的可诱导的核转位和转录激活。(A) GFP-HIF-1 α 嵌合体对低氧响应基因的转录激活。或者用GFP或者用 GFP-HIF-1 α 融合构建体和低氧响应报道基因(HRE-luc)一起共转染COS7细胞。转染6小时后, 在收集之前将细胞接触21% 或1% O₂ 30小时。使标准化的报道基因活性以相对于正常含氧量中非融合GFP的活性表示。给出进行的两个独立实验的以三次重复 $\pm$ SEM的结果。(B) GFP-HIF-1 α 对转录的激活是Arnt-依赖性的。或者用GFP或者用 GFP-HIF-1 α 表达载体和低氧响应报道基因(HRE-luc, 存在野生型Arnt 或显性失活Arnt突变体, Arnt Δ b, 缺少DNA结合 b结构域)一起共转染COS7细胞。在收集之前将细胞接触21% 或1% O₂ 30小时并且测定报道基因。使标准化的报道基因活性以相对于正常含氧量中非融合GFP的活性表示。给出进行的两个独立实验的以三次重复 $\pm$ SEM的结果。(C) GAL4-HIF-1 α 融合蛋白的功能分析。和A栏中表征的一样的HIF-1 α 亚区与GAL4 DNA结合域(GAL4 DBD)融合, 并且和一个在GAL4结合位点的5个拷贝的控制下由胸腺苷激酶最小启动子驱动的表达荧光素酶基因的报道基因质粒一起转染到COS7细胞

中。在收集之前将细胞接触21% 或1% O_2 30小时并且测定报道基因。使标准化的报道基因活性以相对于正常含氧量中非融合GAL4DBD的活性表示。给出进行的两个独立实验的以三次重复 $\pm$ SEM的结果。(D) GAL4- HIF-1 α 的组成型核定位。用p CMX- GAL4- HIF-1 α 瞬时转染COS7细胞并且在表达24小时之后在免疫细胞化学观察之前暴露给正常含氧量 (21% O_2) 或低氧 (1% O_2) 条件6小时。使用抗-GAL4-DBD 抗血清, 生物素化抗-兔Ig 抗体, 和与streptoavidin偶联的 Texas Red 进行对表达的GAL4- HIF-1 α 融合蛋白的间接免疫荧光分析。

如图7所示测定了HIF-1 α 对CBP辅激活蛋白的低氧-依赖性募集。(A) CBP对低氧响应基因表达的刺激。或者用GFP - HIF-1 α 或者用GFP- HIF-1 α K719T 与HRE-荧光素酶报道基因和Rous 肉瘤病毒(RSV)-驱动 CBP 表达载体(或者空表达质粒) 一起共转染 COS7 细胞。转染之后6小时收集细胞之前将细胞接触21 % 或1% O_2 30小时。用碱性磷酸酶表达的PRSV-AF共转染对荧光素酶校正转染效率。以相对于正常含氧量的GFP - HIF-1 α 的值表示该数据。(B) 消除可诱导细胞核输入的NLS突变不影响CBP的低氧依赖性募集。 GAL4- HIF-1 α 或 GAL4- HIF-1 α 反式激活结构域融合蛋白和有或没有CBP表达质粒的GAL4响应报道基因质粒一起被转染到COS7 细胞中。收集细胞之前将细胞接触21 % 或1% O_2 30小时并且分析报道基因。(C) CBP靶向HIF-1 α 的C-末端反式激活结构域。在有或没有CBP表达载体存在下, 将包含最小C-末端反式激活结构域(776-826位氨基酸) 或者其缺失突变体的GAL4 融合蛋白和GAL4响应报道基因质粒一起转染到COS7 细胞中。收集细胞之前将细胞接触21 % 或1% O_2 30小时并且分析报道基因。用碱性磷酸酶活性校正转染效率之后, 以相对于正常含氧量的GAL4的值表示该报道基因活性。

如图8所示测定了转录辅激活蛋白TEF2 增强HIF-1 α -介导的反式激活功能并且在体内与HIF-1 α 相互作用。如材料和方法中所述, 用指明的0.5 μ g pT81/HRE-Luc 报道基因构建体, hHIF1- α 表达载体(pCMV4/HIF-1 α , 0.2 μ g), Arnt 表达载体(pCW4/Arnt, 0.2 μ g) 和0.75-1.5 μ g 或者TIF2 (pSG5/TIF2) 或者 CBP (Rc/RSV-CBP-HA)瞬时共转染COS 7细胞。适当时通过加入亲本pCMV4保持DNA 总量不变。转染后, 或者在正常含氧量(21% O_2) 或者在低氧条件下(1% O_2) 孵育细

胞。用碱性磷酸酶表达的PRSV-AF共转染对荧光素酶活性校正转染效率。以相对于用pCMV4和只有报道基因并且在正常含氧量下温育转染的细胞的荧光素酶活性表示数据。以两次独立实验的平均值 $\pm$ S. E. 表示数值。

如图9所示测定了转录辅激活蛋白SRC-1以低氧-依赖性方式刺激HIF-1 α -活性并且在体外与HIF-1 α 相互作用。用指明的0.5 μ g pT81/HRE-Luc, 0.2 μ g pCMV4/HIF-1 α (hHIF1- α), 0.2 μ g pCWV4/Arnt (Arnt) 和 0.75-1.5 μ g SRC-1 (pSG5/ SRC-1)共转染(A)COS 7细胞和(B)人胚胎肾293细胞。转染后,收获前使细胞接触21%或1% O₂36小时。以图1图例中描述的相对荧光素酶活性表示荧光素酶值。给出重复三次独立实验的结果 $\pm$ S. E.。(C)对于与HIF-1 α 功能性相互作用来说不需要SRC-1 PAS 结构域。(上)图示代表全长 SRC-1 和 SRC-1 Δ PAS。(下) pGAL4/HIF 71-826 与表达荧光素酶基因的报道基因质粒和1.5 μ g全长SRC-1或SRC-1的缺失突变体,缺失PAS结构域的SRC-1 Δ PAS一起共转染到COS7 中,所述荧光素酶基因的表达是在5个拷贝的GAL4结合位点的控制下由胸苷激酶最小启动子驱动。收获前使细胞接触21%或1% O₂36小时并且测定报道基因。以图1图例中描述的相对荧光素酶活性表示荧光素酶值。给出重复二次两个独立实验的结果 $\pm$ S. E.。(D) SRC-1和HIF-1 α 之间的体外相互作用。用10 μ g表达质粒pGST-HIF-1 α (GST-HIF)或者空GST 表达载体 (GST)转染COS7 细胞。细胞接触100 μ M CoCl₂ 或赋形剂(H₂O) 24小时。制备细胞提取物并且与[35S]甲硫氨酸-标记的体外翻译的SRC-1蛋白质一起温育。该复合物在谷胱甘肽-琼脂糖小球上固定2小时并且用沸腾的样品缓冲液洗脱。在5% SDS-PAGE 上分析洗脱出的材料并且用荧光自显影图观察。1/5 $\times$ 输入 (Input) 代表结合反应中使用的[35S]甲硫氨酸-标记的SRC-1的量的五分之一。左边给出分子量标记的位置。

如图10所示测定了对于HIF-1 α 介导的反式激活功能和对于体内与HIF-1 α 的相互作用来说不需要SRC-1的LXXLL 基元。图示代表 全长SRC-1和突变体SRC-1 M1234。黑色条框代表线性SRC-1 序列中LXXLL 基元的大体位置;带编号的圈指LXXLL 基元的突变位点,其中保守的亮氨酸残基被丙氨酸置换。(下) pGAL4/HIF 71-826 与GAL4-

响应报道基因质粒和1.5 μ g全长SRC-1或突变的SRC-1, SRC-1M1234一起共转染到COS7 细胞中。收获前使细胞接触21%或1% O_2 36小时并且测定报道基因。以图1图例中描述的相对荧光素酶活性表示荧光素酶值。给出重复二次两个独立实验的结果 $\pm$ S. E.。

如图11所示测定了CBP 和SRC- 1辅激活蛋白调节的HIF- 1 α 结构的定义。(A) HIF- 1 α 的不同亚区与GAL4 DBD融合并且在不存在或存在1.5 μ g CBP 或SRC- 1表达质粒下与GAL4-4响应报道基因质粒一起转染到COS7 细胞中。收获前使细胞接触21%或1% O_2 36小时。(B) Arnt 的C-末端反式激活区域介导CBP 和SRC- 1的转录激活。用指示的GAL4/Arnt 融合蛋白和1.5 μ g CBP 或SRC- 1与 GAL4-响应报道基因质粒一起共转染COS7 细胞。转染后6小时,收获前使细胞接触21%或1% O_2 36小时并且测定报道基因。(C) HIF-1 α 防止Arnt与CBP 和SRC-1功能性相互作用。GAL4/Arnt 128-774 和缺失突变体(GAL4/Arnt 128-603),如所指出的,与0.2 μ g h HIF-1 α 表达载体和1.5 μ g CBP 和SRC-1一起转染到COS7细胞中。接触21%或1% O_2 36小时之后测定荧光素酶活性。相对于正常含氧量中非融合GAL4的活性表示校正的报道基因活性。给出重复两次三个独立实验的结果 $\pm$ S. E.。

如图12所示测定了CBP和 SRC- 1协同增强HIF-1 α -介导的转录激活。(A) 用 pCMV4/HIF-1 α 和 0.75-1.5 μ g of SRC-1 和 / 或 0.75-1.5 μ g of CBP 表达质粒与低氧-响应报道基因 (pT8 1 /HRE-Luc) 一起瞬时共转染COS7 细胞,并且接着接触21 % 或1% O_2 。以图1图例中描述的相对荧光素酶活性表示荧光素酶值。给出重复二次三个独立实验的结果 $\pm$ S. E.。(B) GAL4/HIF- 1 α 融合蛋白的CBP 和SRC- 1 引起的协同激活。用GAL4/HIF- 1 α 融合构建体在不存在或存在CBP 和/或SRC- 1下,如所指出的(以 μ g计),与GAL4-响应报道基因质粒一起共转染COS7细胞。收集之前使细胞接触21 % 或1 % O_2 。使用碱性磷酸酶活性校正转染效率之后以相对于正常含氧量中GAL4的活性表示报道基因活性。给出重复两次进行的两个独立实验的结果 $\pm$ S. E.。(C) p300 蛋白质以低氧-依赖性方式刺激HIF-1 α 的两个最小反式激活结构域的活性。(右栏)图示代表 全长p300 (pCWV β -p300-HA) 和 p300 Δ (pCWV

β -p300 Δ 1254-1376) (左栏) HIF-1 α 的两个最小反式激活结构域与 GAL4 DBD 融合并且在不存在或存在 p300, p300 Δ 和/或 SRC-1 表达载体下, 如所指定的, 与 GAL4-响应报道基因质粒一起转染到 COS7 细胞中。收集之前使细胞接触 21% 或 1% O₂。以相对于正常含氧量中 GAL4 的活性表示校正过的报道基因活性。给出重复两次进行的一个代表实验的结果。

如图 13 所示测定了 Ref-1 增强 HIF-1 α 功能。(A) 用不同的 GAL4/HIF-1 α 融合构建体在不存在或存在 1.5 μ g Ref-1 (pCMV5/Ref-1) 下, 如所指出的, 与 GAL4-响应报道基因质粒一起共转染 COS7 细胞。收集之前使细胞接触 21% 或 1% O₂。使用碱性磷酸酶活性校正转染效率之后, 以相对于正常含氧量中 GAL4 的活性表示报道基因活性。给出重复两次进行的两个独立实验的结果 $\pm$ S. E.。(B) Ref-1 加强 HIF-1 α 的 CBP 和 SRC-1 激活。和 (A) 中所示一样的 GAL4/HIF-1 α 融合蛋白在不存在或存在不同组合的 Ref-1 (0.75 μ g), CBP (0.75 μ g), 和/或 SRC-1 (0.75 μ g) 下, 如所指出的, 与 GAL4-响应报道基因质粒一起共转染到 COS7 细胞中。下栏表示点标记的面积的增加。

如图 14 所示测定了多水平调节 HIF-1 α 活性的模型。低氧导致蛋白酶体-介导的降解的抑制, 并且结果稳定蛋白质 (1), 并且通过暴露其细胞核定位信号而刺激 HIF-1 α 的核输入 (2)。接着, Arnt 配偶体因子在细胞核中补充 HIF-1 α , 并且得到的 HIF-1 α /Arnt 杂二聚体识别靶基因的低氧响应元件 (HRES) 并且 (3) 与转录辅激活蛋白 (例如 CBP/p300) 功能性相互作用以激活靶启动子。细胞核中发生的事件的顺序 (Arnt 二聚合作用, DNA 结合, 和 CBP 的补充) 还不曾得知。

附图说明

图 1 显示了 HIF-1 α 表现出诱导低氧核转位。

图 2 显示了 GFP-HIF-1 α 对核转位的低氧调节。(A) 图示说明 GFP 和 GFP-HIF-1 α 蛋白质结构。(B) GFP-HIF-1 α 融合蛋白的低氧和低氧模拟的化学品诱导的快速核转位。(C) 低氧诱导正调节内源 HIF-1 α , 而不是 GFP-HIF-1 α , 蛋白质水平。(D) 时间依赖性 GFP-HIF-1 α 的核转

位。(E) 曲线代表GFP- HIF-1 α 的细胞核进入。

图3显示了低氧信号消除时HIF-1 α 的细胞核输出。(A) 实验策略大纲。(B) 去除2, 2' -联吡啶时HIF-1 α 从细胞核中再分布。

图 4显示了GFP- HIF-1 α 融合蛋白的亚细胞分布。(A) 融合蛋白的图示。(B) GFP- HIF-1 α 融合蛋白的亚细胞分布。

图5显示了鉴定HIF-1 α 的C-末端中低氧-诱导NLS基元。(A) 分析人(h) 和小鼠(m) HIF-1 α 序列发现两个保守的核定位信号(NLS) 基元。(B) NLS 基元中的点诱变对GFP- HIF-1 α 融合蛋白在细胞核中的积聚的影响。

图6显示了重叠的C-末端结构介导通过HIF-1 α 的可诱导的核转位和转录激活。(A) GFP-HIF-1 α 嵌合体对低氧响应基因的转录激活。(B) GFP- HIF-1 α 对转录的激活是Arnt-依赖性的。(C) GAL4- HIF-1 α 融合蛋白的功能分析。(D) GAL4- HIF-1 α 的组成型核定位。

图7显示了HIF-1 α 对CBP辅激活蛋白的低氧-依赖性募集。(A) CBP对低氧响应基因表达的刺激。(B) 消除可诱导细胞核输入的NLS 突变不影响CBP的低氧依赖性募集。(C) CBP靶向HIF-1 α 的C-末端反式激活结构域。

图8显示了转录辅激活蛋白TEF2 增强HIF-1 α -介导的反式激活功能并且在体内与HIF-1 α 相互作用。

图9显示了转录辅激活蛋白SRC-1以低氧-依赖性方式刺激HIF-1 α -活性并且在体外与HIF-1 α 相互作用。

图10显示了对于HIF-1 α 介导的反式激活功能和对于体内与HIF-1 α 的相互作用来说不需要SRC- 1的LXXLL 基元。

图 11显示了CBP 和SRC- 1辅激活蛋白调节的HIF- 1 α 结构的定义。(A) HIF- 1 α 的不同亚区与GAL4 DBD融合并且在不存在或存在1.5 μ g CBP 或SRC- 1表达质粒下与GAL4-4响应报道基因质粒一起转染到COS7细胞中。(B) Arnt的C-末端反式激活区域介导CBP 和SRC- 1的转录激活。(C) HIF-1 α 防止Arnt与CBP 和SRC-1功能性相互作用。

图12显示了CBP和 SRC- 1协同增强HIF-1 α -介导的转录激活。(A) 用pCMV4/HIF-1 α 和 0.75-1.5 μ g of SRC-1 和/或 0.75-1.5 μ g of CBP

表达质粒与低氧-响应报道基因 (pT8 1 /HRE-Luc) 一起瞬时共转染 COS7 细胞, 并且接着接触21 %或1% O_2 。 (B) GAL4/HIF-1 α 融合蛋白的CBP 和SRC-1 引起的协同激活。 (C) p300 蛋白质以低氧-依赖性方式刺激HIF-1 α 的两个最小反式激活结构域的活性。

图13显示了Ref-1增强HIF-1 α 功能。 (A) 用不同的GAL4/ HIF-1 α 融合构建体在不存在或存在1.5 μ g Ref-1(pCMV5/Ref-1)下, 如所指出的, 与GAL4-响应报道基因质粒一起共转染COS7细胞。 (B) Ref-1加强HIF-1 α 的CBP 和 SRC-1激活。

图14显示了多水平调节HIF-1 α 活性的模型。

具体实施方式

1. HIF-1 α 表现出低氧-诱导核输入

为了研究HIF-1 α 的细胞内定位, 我们用CMV启动子-驱动HIF-1 α 表达载体瞬时转染猴的COS7 细胞。表达24小时之后, 在正常含氧量(21% O_2) 或低氧(1% O_2) 条件下将细胞又培养6小时。用多克隆抗-HIF-1 α 抗体(Kallio等, 1997)免疫染色, 显示HIF-1 α 免疫反应主要位于正常含氧量细胞的细胞质中, 在核区室也检测到了一些反应性。令人感兴趣的是, 细胞暴露于低氧导致HIF-1 α 的非常惊人的细胞核积聚, 几乎没有任何可检测的保留在细胞质中的免疫反应性(图 1)。

为了进一步研究HIF-1 α 的激活机理及其在活细胞中的亚细胞定位, 我们构建了携带在CMV启动子控制下表达的全长HIF-1 α 的符合读框的GFP-融合物(图 2A中图示说明)的载体。用亲本GFP构建体或嵌合GFP- HIF-1 α 构建体瞬时转染COS7 细胞后, 在大约20-30%的细胞中发现荧光, 反映出转染效率的水平。只有GFP的荧光在细胞内均匀分布, 低氧处理对荧光活性的强度或亚细胞分布都没有影响(图 2B)。在正常含氧量细胞中瞬时表达GFP- HIF-1 α 构建体得到模拟用单独的GFP观察到的图象的信号, 这样体现出遍布细胞的荧光活性(图2B)。

对于定量目的, 对于HIF-1 α 的区室化作用通常分析200-300 个荧光细胞, 并且再分成四类(Ylikomi 等 (1992) EMBO J. 11, 3681-3694): N, 仅含有核荧光的细胞; N > C, 核荧光比胞质荧光占

优势的细胞; $N = C$, 细胞质和细胞核区室中荧光分布相同的细胞; 和 $N < C$, 细胞质中荧光强度超过细胞核中的荧光强度的细胞。表1给出了属于各类的细胞的百分比。在正常含氧量条件下, 65% 瞬时表达 GFP-HIF-1 α 构建体的细胞 属于 $N = C$ 类; 而有限数的细胞 (8%) 表现出优先的 HIF-1 α 核区室化作用 (N类)。相反, 细胞暴露给低氧 (1% O_2) 导致 GFP-HIF-1 α 的几乎完全的核积聚 (图2B), 其中90% 在转染细胞表现出仅是核荧光 (N类; 表I)。此外, 用已知模拟靶基因表达的低氧诱导 (Wenger 和 Gassmann (1997) 生物化学 (Biol. Chem.) 378, 609-616) 和 HIF-1 α DNA 结合活性的诱导 (Wang 等 (1995) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 92, 5510-5514; Gradin等 (1996) 分子细胞生物学 (Mol. Cell Biol.) 16, 5221-5231) 的化合物, 例如 $CoCl_2$ 或者 2, 2'-联吡啶 (DP) 铁螯合物, 处理细胞, 也诱导 GFP-HIF-1 α 的核输入。事实上, 我们没有观察到这些诱导 HIF-1 α 的核转位的处理的力度的任何定量或定性差异 (图 2B)。

我们和其它人最近证实了响应低氧的 HIF-1 α 的激活的关键机理是正调节 HIF-1 α 蛋白质水平。该响应取决于 HIF-1 α 蛋白质的稳定化作用而不是提高的 HIF-1 α mRNA 表达水平或增强的 HIF-1 α mRNA 的翻译的结果 (Huang 等 (1996) 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 271, 3225-3229; Kallio等 (1997) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 94, 5667-5672; Salceda 和 Caro (1997) 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 272, 22642-22647)。因为我们没有检测到 GFP-HIF-1 α 在低氧刺激时荧光相对强度的任何改变 (图2B), 我们通过免疫印迹分析检测转染后瞬时转染的正常含氧量细胞或者暴露给低氧 (1% 氧) 的细胞中 GFP-HIF-1 α 蛋白质的表达水平。如图 2C 所示, 检测到, 与正常含氧量细胞相比, 低氧细胞中 GFP-HIF-1 α 蛋白质的表达水平没有提高 (比较 3 和 4 道)。但是, 作为参考, 暴露给低氧的细胞的提取物中内源 HIF-1 α 水平被正调节 (图

2C, 2 和4道, 星号指内源HIF-1 α)。事实上, 如早期的文献指出的(Kallio等, 上文), 由于快速周转, 在正常含氧量的细胞中基本上检测不到内源HIF-1 α (图2C, 1和3道)。因此这些实验证明在正常含氧量的细胞中GFP 有效稳定HIF-1 α , 并且GFP 融合蛋白的用途使得我们忽略调节HIF-1 α 功能的早期水平, 并且使我们研究不加上蛋白质返转调节复杂性情况下细胞内HIF-1 α 的区室化作用。

COS7细胞暴露给低氧或低氧-模拟化合物例如2, 2'-联吡啶时, GFP-HIF-1 α 的核积聚动力学表现出大约30分钟的核转移半最大时间(图2D和E)和在+37 $^{\circ}$ C下暴露1小时之后蛋白质的完全核输入。与其它表现出信号诱导核输入的转录因素相比这些动力学十分缓慢。例如, 对于糖皮质激素受体报道过可诱导核转运明显快得多的时间进程(Ogawa 等 (I 995) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 92, 11899-11903; Carey等 (I 996) 细胞生物学杂志(J. Cell Biol.) 133, 985-996; Htun 等 (I 996) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 93, 4845-4850), 配体-依赖性转录因子表现出激素依赖性核转位。

为了进一步表征活细胞中 HIF-1 α 区室化作用的低氧信号-依赖性调节, 我们接着提问了暴露给低氧后接着将细胞恢复到正常含氧量或者去除低氧-模拟化合物是否影响 GFP-HIF-1 α 的细胞内定位。结果我们通过用 2, 2'-联吡啶处理转染的细胞 1 小时第一次诱导 GFP-HIF-1 α 的核输入 (84% 的细胞属于 N 类)。接着通过在培养基中洗涤细胞去除 2, 2'-联吡啶, 再在正常水平的大气氧压下培养细胞(在图 3A 中图示表示)。在正常含氧量条件下培养 12 小时之后, 75% 的转染细胞在细胞核和细胞质区室两者中表现出相等的 GFP-HIF-1 α 分布(C = N 类), 和 GFP-HIF-1 α 的专一的细胞核聚集(N 类) 由 84% 减少到 5% (图 3B)。在去除 2, 2'-联吡啶 24 小时之后观察到几乎相同的 GFP-HIF-1 α 分布(图 3B)。因此, 低氧-诱导的 GFP-HIF-1 α 核保留可能会在去除

低氧信号之后反转。为了解决该反转是否依赖于从头合成的 GFP-HIF-1 α 的不成分的核输入,我们也进行了该项在蛋白质合成抑制剂环己酰亚胺存在下的去除实验。在这些条件下,2,2'-联吡啶诱导的 GFP-HIF-1 α 核保留的反转与没有环己酰亚胺存在下所观察到的非常类似,即 GFP-HIF-1 α 的核聚集(N类)从 84% 减少到 3%,伴随着属于 C=N 类的 GFP-HIF-1 α 的聚集从 6% 增加到 82% (图 3B),表明蛋白质的原始核聚集的输出。

2. PAS域在HIF-1 α 的核输入的调节中的作用

为了鉴定HIF-1 α 的核输入中涉及的结构基元,我们制备了多种包含与HIF-1 α 的不同的亚结构域融合的GFP 的表达载体(图4A中图示表示)。这些构建体在COS 7细胞中瞬时表达之后,将这些细胞或者接触2,2'-联吡啶或者放置不处理6小时,接着分析该融合蛋白的区室化作用。如4B中所示,覆盖b HLH 基元 (aa 1-74; SEQ ID NO: 2)的HIF-1 α 的大多数N-末端区与GFP的融合导致该蛋白质在正常含氧量条件下的优先核积聚。此外,接触2,2'-联吡啶不改变该蛋白质的核积聚(图 4B和表 I)。事先证明b HLH 结构域中碱性DNA结合域对于b HLH-PAS转录因子Arnt和dioxin (芳基烃)受体的核定位是足够的(Eguchi 等 (I 997) 生物化学杂志(J. Biol. Chem.)272, 17640-17647; Ikuta 等 (I 998) 生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 273, 2895-2904)。因此,与这些蛋白质类似,该分离的HIF-1 α 的bHLH 结构域介导组成型核输入。与这些发现极好吻合的是,HIF-1 α 在氨基酸17-33之间包含一个类似于*of xenopus laevis* 核质蛋白的两部分组成的NLS 基元 (Dingwall 等 (I 987) EMBO J. 6, 69-74) (图 5A)。

令人感兴趣的是,HIF-1 α 的N-末端部分延伸至覆盖除了bHLH外还有PAS-A 基元 (HIF-1 α /1-245;图 4A; SEQ ID NO: 3) 或整个PAS

结构域(HIF-1 α /1-330; SEQ ID NO: 4)的片段产生GFP-融合蛋白,其中bHLH结构域中的组成型NLS基元看起来是隐藏的。和HIF-1 α /1-74不一样,这两种蛋白质表现出显著的胞质荧光活性(图4B),该荧光活性在正常含氧量和低氧条件下都可检测并且分别得到N=C类转染细胞26%-95%的分数(表I)。这些结构表明PAS结构域具有抑制HIF-1 α 的bHLH结构域中的NLS基元介导的核输入结构,导致该蛋白质在胞质中停留。该模型对此的有力支持中,包含缺失PAS结构域的重要部分最特别是PAS B基元(HIF-1 α /Δ178-390;图4A; SEQ ID NO: 6)的HIF-1 α 突变体的GFP融合蛋白,在正常含氧量条件下,荧光主要在于细胞核(图4B),得到80%的核评分(N和N>C类)(表I)。暴露给低氧对GFP-HIF-1 α /Δ178-390的亚细胞定位没有其它影响(图4B;表I)。因此,去除HIF-1 α 的PAS结构域中的抑制基元或胞质停留信号导致将该蛋白质从低氧调节中解偶联。

3. 鉴定HIF-1 α 的C-末端中的NLS基元

为了进一步研究哪一个结构基元介导低氧-诱导HIF-1 α 的核区室化作用并且构成HIF-1 α 的功能体系结构,我们接着检测了包含位于该PAS结构域的C-末端的HIF-1 α 结构的GFP融合蛋白的细胞内定位,所述融合蛋白即融合蛋白GFP-HIF-1 α /331-641和GFP-HIF-1 α /526-641(图4A)(SEQ ID NOS: 7和8分别给出了HIF-1 α /331-641和HIF-1 α /526-641的序列)。这两种蛋白质证明细胞质和细胞核两者中的荧光(100%的细胞属于NC类;表I)不被低氧改变,因此不可区别于亲本GFP蛋白质的性质(图4B)。与我们上面观察的PAS结构域抑制N-末端bHLH结构域中组成型NLS基元介导的核输入相吻合,包含bHLH/PAS结构域和HIF-1 α 的C-末端延伸至氨基酸652的融合蛋白(GFP-HIF-1 α /1-652; SEQ ID NO: 5给出HIF-1 α /1-652的序列)表现出专一胞质/核周定位(图4B),100%转染细胞落入N<C类(表I)。重要的是,和与全长HIF-1 α 融合的GFP不同,GFP-HIF-1 α /1-652对

低氧或联吡啶处理没有响应，因此不能在这些条件下进行核转位，表明正是HIF-1 α 的C-末端携带可以作为用于诱导核积聚的重要的决定簇起作用的序列。惊人地，与覆盖氨基酸526-826的HIF-1 α 的C-末端的GFP融合 (SEQ DD NO:10) 产生证实专一核荧光的蛋白质 (图 4B)。因此，如图5A所示，HIF-1 α 在该蛋白质的该区包含第二个NLS基元。事实上，序列分析表明HIF-1 α 氨基酸718这部分存在一个真实的SV40大T抗原型NLS基元，特征在于单一一簇四个连续的碱基，RKRK。在小鼠HIF-1 α 蛋白质中该基元也是保守的 (图 5A)。在正常含氧量和低氧条件下都检测到包含该基元的GFP-HIF-1 α /526-826引起的核荧光，证明携带该第二SV40大T抗原型NLS基元的HIF-1 α 的该结构域介导组成型核输入 (图4B；表I)。

4. C-末端NLS基元中一个单一氨基酸特别破坏低氧可诱导的全长HIF-1 α 的核输入

如果HIF-1 α 的C-末端中存在第二个NLS基元并且HIF-1 α 的N-末端部分不能表现出低氧-诱导核积聚，我们通过诱变分析研究了N-和C-末端NLS基元在可诱导的核输入中的作用。为此我们在全长HIF-1 α 中引入HIF-1 α 的N-末端由两部分组成的NLS基元的N-末端Arg残基的一个或两个变化，或者在C-末端NLS基元中将Lys 719诱变为Thr (图5A)。如图5B所示，N-末端NLS基元中的点突变不影响HIF-1 α 的低氧可诱导核转位。但是重要的是，C-末端NLS基元中单一氨基酸变化导致HIF-1 α 在细胞核中响应低氧的积聚的能力戏剧性降低 (图5B)，得到主要地细胞质定位蛋白质评分(N < C类)，正常含氧量期间为96%低氧条件下为81% (Table II)。结果，这些实验证明HIF-1 α 的C-末端NLS基元介导低氧-诱导的该蛋白质的核输入。

C-末端NLS基元中引入相同的氨基酸变化严重削弱该与GFP融合的分离的HIF-1 α 的C-末端的组成型核积聚 (将表I中的GFP-HIF-1 α /526-826与表II中的GFP-HIF-1 α /526-826K719T相比较)。因此，尽管分离的C-末端NLS基元介导组成型活性，其在全长HIF-1 α 中表现出低氧-诱导活性。因为缺少PAS结构域的主要部分，大多数特别是

PAS-B基元的GFP-HIF-1 α /Δ 178-3 90 (图4A), 表现出组成型核定位(图4B 和 5B), 表现出C-末端NLS基元与PAS 结构域以密切配偶体关系在介导可诱导核输入响应中起作用。为了试验该观点, 我们在PAS B 缺失突变体GFP-HIF-1 α /Δ 178-3 90中引入Lys 719变为Thr 的单一氨基酸变化。 令人感兴趣的是, 该双突变体在正常含氧量或低氧条件下没有表现出任何明显的核输入 (图 5B), 得到主要定位于细胞质区室的评分, 分别是82 %和85% (N < C类) (Table II)。总之, 这些结果证明 N-末端碱性区域不作为全长蛋白质中的NLS基元起作用, 和C-末端 NLS 基元在介导HIF-1 α 的可诱导核输入中起着关键作用。

5. HIF-1 α 响应低氧的多步骤激活途径的证据

我们接着在功能共转染测试中检测了GFP- HIF-1 α 融合蛋白的能力, 其中 GFP-HIF-1 α 表达载体和在单纯疱疹胸腺嘧啶脱氧核苷激酶启动子和荧光素酶基基因之前携带三个串联的红细胞生成素低氧效应元件(BRE)的拷贝的低氧-响应基因报道基因构建体一起引入到COS7 细胞中。不存在共表达的蛋白质或者在瞬时表达的亲本 GFP的存在下通过低氧处理(1% O₂; 图 6A)或者用2, 2'-联吡啶培养(没有给出数据)没有明显改变报道基因活性, 最可能是由于COS7细胞中的内源HIF-1 α 活性的低水平。但是, GFP-HIF-1 α 的共表达在正常含氧量下就已经导致刺激报道基因活性 (大约2倍), 可能由于如上所述GFP部分对HIF-1 α 水平的稳定作用, 在这些条件下小的但是可检测的HIF-1 α 的积聚位于细胞核。低氧进一步刺激报道基因活性大约4倍 (图 6A)。在对照实验中, 野生型HIF-1 α 的瞬时表达也得到相似模式的报道基因激活, 虽然具有稍微低一些的效力, 当暴露给低氧时产生大约2倍的激活响应。因此, GFP与紧邻接的N-末端碱性(DNA结合)区的融合物不干扰转录激活。事实上, GFP 部分对融合蛋白的稳定化作用(图2C)可能确实增强HIF-1 α 产生的激活响应的效率。如所预期的, 在该项功能测定中, 缺失DNA 结合bHLH 区的 GFP-HIF-1 α 融合蛋白(GFP-HIF-1 α /331-641,

GFP-HIF-1 α /526-641和GFP-HIF-1 α /526-826)不诱导任何报道基因活性。

尽管野生型Arnt的异位表达不显著增强GFP-HIF-1 α 的低氧-诱导转录激活,缺失DNA结合碱性(b)结构域的显性失活Arnt突变体,Arnt Δ b(Lindebro等(I 995) ENMO J. 14, 3528-3539)的瞬时表达导致对低氧-依赖性激活响应的强有力的抑制(图 6B)。因此,这些结果证明GFP-HIF-1 α 引起的HRE-驱动的报道基因表达的低氧-诱导的转录激活关键取决于与bHLH-PAS配偶体因子 Arnt的相互作用。与这些结果相一致,缺失与Arnt的重要的二聚合界面(Lindebro等,上文)PAS-B结构域的突变体GFP-HIF-1 α / Δ 178-390没有响应低氧而显著诱导HRE-依赖性报道基因表达(图6A)。

为了分析HIF-1 α 独立于内源DNA结合和二聚合作用结构域和Arnt配偶体的功能活性,我们接着将HIF-1 α 与异源GAL4的DNA结合域融合。使用在胸腺嘧啶脱氧核苷激酶启动子和荧光素酶基因前面携带5个的GAL4 DNA结合元件的报道基因构建体通过校正测试监测COS7细胞中融合蛋白的功能活性。转染之后6小时更换培养基,细胞或者放置不诱导或者在收集之前暴露给1%的氧30小时。在空表达载体或者表达最小结合域的载体存在下,通过降低氧的水平不改变报道基因活性。正常含氧量下GAL4-HIF-1 α 的瞬时表达导致合适的(大约4-至5-倍)报道基因激活(图 6C)。但是,当在1%氧下培养细胞时(图 6C;或者用100 μ M 2,2'-联吡啶;没有给出数据),GAL4-HIF-1 α 的功能活性被进一步增强大约2-倍,导致超过背景水平大约8-至10-倍的报道基因活性的刺激(图 6C)。该GAL4 DNA结合域已知携带能将融合蛋白带给细胞核的一个NLS基元(Ma和Ptashne (1987) Cell 51, 113-119)。因此我们使用了抗GAL4的DNA结合域的抗体来通过免疫荧光检查正常含氧量和低氧细胞中GAL4-HIF-1 α 融合蛋白的细胞内定位。如图 6D所示,GAL4 DNA结合域介导GAL4-HIF-1 α 融合蛋白的组成型细胞核定位(图6D)。给出GAL4-HIF-1 α 表现出低氧-诱导功能活性的事实,这些数据证明HIF-1 α 的可诱导核输入对于转录激活是

不足的, 表明HIF- 1 α 暴露给低氧时多步骤激活途径。

6. 重叠 C-末端结构介导HIF- 1 α 可诱导核转位和转录激活

以缺失分析为基础, 已报道过HIF- 1 α 携带两个反式激活结构域 (Jiang 等 (1997) 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 272, 19253-19260; Pugh 等 (1997) 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.). 272, 11205-11214)。尽管存在的数据与这两个结构域的表达水平的低氧可诱导性相矛盾, 但是最小反式激活结构域在图谱中已经确定是残基531-582 和 775-826。与这些发现相吻合, 缺失反式激活结构域但是表现出组成型核转位的 GFP- HIF- 1 α 片段(例如GFP- HIF- 1 α /1-74) 不诱导报道基因活性。以相似的方式, 融合蛋白GFP- HIF- 1 α /1-245 和 GFP- HIF- 1 α /1-330 完全没有任何功能活性 (没有给出数据)。此外, 没有刺激HRE-依赖性报道基因活性超过背景值的GFP- HIF- 1 α /1-652的瞬时表达 (图 6A), 尽管该蛋白质包含一个HIF- 1 α 的反式激活结构域, 当与GAL 4 DNA结构域融合时导致转录激活(图6C), 以类似于瞬时表达的GFP- HIF- 1 α 的水平表达(没有给出数据)。该结果与GFP- HIF- 1 α /1-652不能进入细胞核相一致(图4B)。结果, 这些数据证明可诱导的核定位和反式激活功能, 尽管包含在HIF- 1 α 的 C-末端中, 代表可以相互分开的不同的功能整体。HIF- 1 α 中缺失最多13个 C-末端氨基酸残基导致在 GFP-HIF-1 α /1-813 和 GAL4-HIF-1 α /1-813 (图 6A和6C)情况下转录活性的显著降低的发现进一步强化了该结论, 尽管这两种蛋白质能够进入细胞核(图 4B 和没有给出数据)。

7. CBP辅激活蛋白的HIF- 1 α - 低氧-依赖性募集引起的转录激活被从可诱导NLS基元功能性去偶联

CREB 结合蛋白CBP是一种已知与多种组成型活性或可诱导DNA结合转录因子相互作用的转录辅激活蛋白蛋白质, 其中所述组成型活性或可诱导DNA结合转录因子其中包括CREB, c-Fos, c-Jun, 类固醇受体超家族的各成员, 和 p53 (Shikama 等 (1997) 细胞生物学动态

(Trends Cell Biol.) 7, 230-236)。还已经证明CBP与HIF-1 α 实际上相关并且在Hep3B 细胞中红细胞生成素启动子的低氧依赖性反式激活中起着作用 (Arany 等(1996)美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)93, 12969-12973)。因此我们开始检验CBP的过表达表对最小HRE-驱动报道基因的GFP-HIF-1 α 引起的低氧-依赖性激活的影响。正如所预期的, 低氧条件下的GFP-HIF-1 α 的瞬时表达导致与正常含氧量条件下观察到的激活响应相比大约 4- 至 5-倍的BRE-依赖性报道基因刺激(图6A 和7A)。GFP-HIF-1 α 与CBP 的共表达进一步将低氧-依赖性激活响应增强大约3-倍, 导致超过在正常含氧量下观察到的水平大约15-倍的报道基因活性刺激, 进一步确立CBP支持HIF-1 α /Arnt复合体的转录 (图7A)。这与证明单一氨基酸突变体GFP-HIF-1 α K719T 蛋白质不能经历可诱导核积聚(图5B 和表II), GFP-HIF-1 α K719T 不产生低氧-依赖性激活响应的数据极好地吻合。此外, GFP-HIF-1 α K719T与CBP 的共表达在低氧条件下不产生任何报道基因活性的显著刺激, 表明核转位-缺陷HIF-1 α 蛋白质功能上与CBP 相互作用。作为另一个对照, 我们检验了暴露给低氧是否影响瞄向CBP调节的其它转录因子的功能。在这些实验中, 我们在报道基因测试中观察到低氧对视黄酸受体的功能活性的CBP引起的配体-依赖性增强没有影响 (没有给出数据), 所述视黄酸受体是完善表征的CBP的靶物 (有关综述, 见Torchia 等(1998) 细胞生物学最新观点(Curr. Opin. Cell Biol.) 10, 373-383)。

如上所述, HIF-1 α 与GAL4 DNA 结合域的融合产生报道基因活性合适(大约 2-倍) 的低氧-依赖性激活的嵌合蛋白(图 6C 和7B)。但是在CBP存在下, 在低氧条件下又观察到报道基因的19倍刺激, 而在正常含氧量条件下, CBP 只是稍微 (2- 至 3-倍) 增强 GAL4-HIF-1 α 活性 (图 7B)。我们接着想检验携带两个HIF-1 α 反式激活结构域并且当与GFP融合时表现出专一核定位的包含C-末端亚区526-826的GAL4 DNA结合域融合蛋白的反式激活能力(图 4B 和 5B)。该嵌合蛋白产生合适(大约 2-倍)的报道基因活性的低氧-依赖性激活, 但是CBP超表

达后有效地增强其可诱导激活功能 (图 7B)。因此, 这些数据证明 HIF-1 α 的C-末端以低氧-依赖性方式恢复CBP。令人感兴趣的是, CBP 也能出人意料地增强在HIF-1 α 的低氧-可诱导NLS基元中携带定点突变的 GAL4-HIF-1 α /526-826 K719T融合蛋白的活性。事实上, CBP 通过GAL4-HIF-1 α /526-826或GAL4-HIF-1 α /526-826 K719T 支持可诱导转录的作用是非常类似的 (图7B), 因此证明低氧-可诱导NLS基元的失活不改变该结构域响应低氧被辅激活蛋白恢复并且接着反式激活的能力。我们还检验了CBP支持分离的C-末端反式激活结构域(氨基酸776-826)与GAL4 DNA结合域融合的功能的能力。令人感兴趣的是, 尽管该结构域在低氧细胞中CBP存在下介导激活作用, 但是其不响应缺失1-13个最C-末端氨基酸之后的CBP (图7C; 比较 GAL4-HIF-1 α /776-826 与 GAL4-HIF-1 α /776-813), 强烈提示这些残基构成CBP引起的低氧-依赖性调节的靶物。

8. TIF2在哺乳动物细胞中以低氧依赖性方式增强HIF-1 α 活性并且与受体相互作用

为了更好地理解HIF-1 α 的转录激活机理, 我们测试了转录辅激活蛋白TIF2的瞬时表达对HIF-1 α 的功能活性的影响。TIF2 属于转录辅激活蛋白的p 160 家族, 已经证明核受体介导的转录激活需要TIF2 (Takeshita 等(1997)生物化学杂志(J. Biol. Chem.)272, 27629-27634)。我们首先使用COS7细胞进行了瞬时转染实验。如图 8 所示, 不存在共表达的蛋白质时低氧处理(1% O₂) 不显著改变报道基因活性, 最可能由于COS7细胞内低水平的内源HIF-1 α 活性 (没有公开的发现)。HIF-1 α 和Arnt瞬时共表达时, pT81/IM-luc 报道基因活性在正常含氧量条件下刺激大约10-倍, 可能由于在这些条件下定位的细胞核中的小的但是可检测的HIF-1 α 的积聚。这些报道基因活性表现出低氧引起的合适增加(大约1.5-倍) (图 8)。但是, 正如所预期的, 当与不存在外源辅激活蛋白下的低氧刺激的活性相比CBP的异位表达以剂量依赖方式进一步增强HIF-1 α 引起的低氧-依赖性激活(2-至

3-倍)。尽管CBP的表达在正常含氧量下已经稍微刺激HIF-1 α 活性,但是其总的活性几乎完全取决于对低氧的暴露,这一点前面已经描述过。由于在感染之前的细胞中已经存在大量的内源CBP,该效果最大限于3-倍。HIF-1 α 与TIF2一起的共表达导致超过正常含氧量下观察到的水平的报道基因的有效激活(大约12-倍),从而确定TIF2和CBP两者支持HIF-1 α /Arnt复合体引起的转录(图8)。结论是,原来鉴定为支持多种类固醇激素受体家族成员引起的激素依赖性转录活性的辅激活蛋白的TIF-2也作为在HIF-1 α /Arnt复合体引起的低氧-依赖性转录活性中的有条件控制的辅激活蛋白。

响应低氧, HIF-1 α 输入细胞核并且表现出严格地核定位。为了表征活细胞中HIF-1 α 对转录激活的TIF2-依赖性增强的机理,我们接着提问TIF2的超表达是否影响HIF-1 α 的细胞内定位。为此我们用编码绿荧光蛋白(GFP)与全长HIF-1 α 的读框内融合物的表达载体瞬时转染了COS7细胞。如上所述,该GFP-HIF-1 α 构建体的荧光在正常含氧量条件下在细胞内均匀分布,用低氧-模拟剂2,2'-联吡啶将转染的细胞处理2小时导致GFP-HIF-1 α 蛋白质的完全核积聚。在正常含氧量下,在GFP-HIF-1 α 的存在下TIF2辅激活蛋白的瞬时转染对荧光活性的强度和亚细胞分布没有影响。但是,共表达GFP-HIF-1 α 和TIF2的细胞暴露给2,2'-联吡啶时,在细胞核中类似点结构中检测到GFP-HIF-1 α -依赖性荧光活性。先前描述过TIF2是主要与细胞核中这样的类似点的不连续体相关的细胞核蛋白质(Voegel等 (I 998) EMBO J. 17, 507-519)。这些发现强有力地提示TIF-2诱导细胞核中GFP-HIF-1 α 的再定位,指示GFP-HIF-1 α 和TIF2在体内相互作用,并且点样的荧光模式可能代表转录活性染色质。

如上所述,暴露给低氧后将细胞恢复正常含氧量或者去除模拟低氧的化合物导致HIF-1 α 的细胞核积聚的输出。为了确定GFP-HIF-1 α 和TIF2之间的体内相互作用是否取决于低氧刺激物,我们因此首先将转染的细胞暴露给2,2'-联吡啶,然后在通过在培养基中洗涤细胞而

去除2, 2' 联吡啶之后在正常空气氧含量水平下进一步将其培养。正如所预期的, 在正常含氧量条件下培养24小时之后, 发现细胞核和细胞质区室两者中GFP-HIF- 1 α 的分布与暴露给低氧信号之前的荧光活性的分布是不可区分的。TIF2的瞬时表达不诱导GFP-HIF- 1 α 的输出中任何定量或定性差别, 证明TIF2对HIF- 1 α 的低氧-诱导的细胞核再定位在去除低氧信号之后可以反转。

9. SRC-1对HIF- 1 α 的低氧-诱导的反式激活功能的调节

如上所述, TIF2 属于包括SRC- 1的p 1 60家族的一个正在生长的家族。TIF2和SRC- I 两者都表现出具有和辅激活蛋白一样的增强配体激活的细胞核激素受体的多个成员的转录效率的相似活性 (Voegel等, 上文)。 SRC-1 已被证实直接地组成型地与CBP相互作用 (Yao等 (1996) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 93, 10626-10631)。而且, 与 CBP类似, SRC-1已经表现出具有固有的一组蛋白酰基转移酶活性 (Spencer等 (1997) Nature 389, 194-198)。以此为背景, 我们测试了SRC- 1调节最小HRE-驱动报道基因的HIF- 1 α -依赖性转录激活的能力。在使用COS7细胞的瞬时转染实验中, 与不存在外源辅激活蛋白下的低氧-刺激活性相比较, HRE-依赖性报道基因活性被SRC-1以剂量-依赖性方式从2-倍刺激到8-倍 (图9A)。正常含氧量条件下 SRC-1 的瞬时表达也增强HIF- 1 α 的转录活性, 尽管达到一个较小的程度 (大约3-倍; 图 9 A)。因此, SRC- 1和 TIF2 都具有增强HIF- 1 α 的转录效率的类似性质。为了确定p 1 60家族辅激活蛋白成员对HIF- 1 α 功能的调节是否是细胞类型特异性的, 我们接着在人293胚胎肾细胞系中进行了类似的转染实验。在这些实验中我们发现SRC- 1 (图9B) 和 TIF2 (没有给出数据) 可以显著增强293细胞内HIF- 1 α -依赖性转录激活。

令人感兴趣的是, 类似于HIF- 1 α , p 1 60 家族的辅激活蛋白

属于更大家族的bHLH/PAS 因子 (在图 9C中图示表示)。 SRC-1最初克隆为一个 N-末端截短的片段 (Ofiate等(1995) Science 270, 1354-1357), 这里称之为 SRC-1 Δ PAS (图 9C), 缺失 bHLH/PAS基元。 bHLH 和 PAS 结构域代表有效的蛋白质/蛋白质相互作用界面, 并且对于HIF-1 α 和Arnt之间的二聚合作用是关键的 (Gradin 等(I 996) 分子细胞生物学 (Mol. Cell Biol.)16, 522 f -5123 1;

Wang等 (I 995) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)92, 5510-5514)。 为了研究SRC-1的bHLH/PAS基元在HIF-1 α 引起的低氧-依赖性反式激活中的作用, 我们检查了SRC-1 Δ PAS 或全长SRC-1的超表达对一种融合蛋白GAL4/HIF 71-826的转录活性的影响, 所述融合蛋白包含读框内与hHIF-1 α 覆盖氨基酸71-826的片段融合的GAL4 DBD。 使用GAL4-响应报道基因监测该构建体的低氧-依赖性激活。 如图 9C所示, 该嵌合蛋白介导报道基因活性的4-倍低氧-依赖性激活。 与SRC-1对HIF-1 α /Arnt复合体介导的转录激活的作用相一致, 在低氧条件下全长SRC-1辅激活蛋白的共表达进一步将GAL4/HIF 71-826增强 大约 12-倍, 导致超过在正常含氧量下观察到的水平大约45-倍的报道基因的刺激 (图9C)。 SRC-1 表现出对单独GAL4 DBD的转录活性没有可检测到的影响 (没有给出数据)。 这些结果证明SRC-1 锚向HIF-1 α 蛋白质。 接着, 我们检验了SRC-1 Δ PAS 突变体对GAL4/HIF 71-826-介导的反式激活的影响。 该截短的辅激活蛋白片段表现出在增强低氧-依赖性激活响应中如果不是比全长SRC-1更有效活性就是表现得非常类似 (图9C)。 因此, 在增强类固醇激素受体-依赖性转录调节中与SRC-1 Δ PAS 野生型活性极好一致 (Ofiate 等, 上文), SRC-1的bHLH 和PAS 基元对于支持HIF-1 α 功能不是重要的。

本发明实验指明CBP 和SRC-1增强低氧细胞中HIF-1 α 引起的转录潜能的功能重要性。 CBP 先前已经证明与HIF-1 α 发生物理相互作用 (Arany等 (1995) Nature 374, 81-84)。 为了研究SRC-1是否能与HIF-1 α 相互作用, 我们使用存在或不存在100 μ M CoCl₂下瞬时表达GST-标记的HIF-1 α 的COS7细胞制备的细胞提取物进行谷胱甘肽-S-

转移酶(GST) 沉淀测试, CoCl_2 是一种已知模拟靶基因表达的低氧诱导并且激活 HIF-1 α 的化合物 (Wenger & Gassmann (1997) 生物化学 (Biol. Chem.) 378, 609-616)。该材料接着与体外翻译的 [35S] 标记的 SRC-1 一起培养。如图 9D 所示, 在 CoCl_2 存在下, 固定在谷胱甘肽-Sepharose 小球上的 GST-HIF-1 α 融合蛋白特异性保留 [35S] 标记的 SRC-1 (4道), 而我们没有观察到与从未处理细胞提取的 GST-HIF-1 α 的显著结合, 或者与单独的 GST 的结合 (2道)。因此, SRC-1 在体外以低氧-依赖性方式与 HIF-1 α 相互作用。

10. LXXLL 基元在 HIF-1 α -SRC-1 相互作用中的作用

SRC-1 包含短序列基元 LXXLL 的四个拷贝。在该蛋白质的中心相互作用结构域中鉴定了这些基元中的三个, 并且在人 SRC-1 的 8 个最 C-末端氨基酸中发现了第四个基元 (Heery 等 (1997) Nature 387, 733-736)。证明该 LXXLL 基元对于介导 SRC-1 与细胞核受体占据的配体的结合是必需的。为了研究 SRC-1 的 LXXLL 基元在 HIF-1 α 引起的低氧-依赖性反式激活中的作用, 我们在瞬时转染实验中比较了野生型 SRC-1 和 SRC-1 M1234 的能力, SRC-1 M1234 是一种突变蛋白, 其中分别在残基 636/7, 693/4, 752/3 和 1438/9 处将保守的亮氨酸 (couplets) 取代为丙氨酸。如图 10 所示, 其中所有四个功能结合基元失效的突变蛋白在低氧条件下将 GAL4/HIF 71-826 的活性增强到和野生型 SRC-1 一样的程度。此外, 野生型 SRC-1 或 SRC-1 M1234 与 GST-HIF-1 α 蛋白质在 COS7 细胞中的瞬时表达对正常含氧量下荧光活性的亚细胞分布没有影响。在低氧条件下, SRC-1 诱导 GST-HIF-1 α 的再定位从均匀的核分布到在细胞核中不连续的象点一样的结构。SRC-1 M1234 蛋白也产生这样的效果, 表明这两种蛋白质在体内以低氧-依赖性方式与 HIF-1 α 相互作用。这些结果一起证明, 与细胞核受体信号传导相反, LXXLL 基元对于 HIF-1 α -SRC-1 相互作用不是必需的。

11. 与辅激活蛋白CBP 和SRC-1相互作用的HIF-1 α 的功能结构域的定义

为了鉴定可以作为与SRC-1和CBP辅激活蛋白相互作用界面的HIF-1 α 结构,我们构建了一系列包含不同长度的HIF-1 α 片段的GAL4 DBD 融合蛋白(如图11A图示说明)。

这些构建体与GAL4响应报道基因一起被瞬时转染到COS7 细胞中。在没有异位表达的辅激活蛋白存在下,全长 HIF- 1 α 与 GAL4 DBD 的融合产生显著的报道基因活性的低氧-依赖性诱导(如图11A)。 CBP 或 SRC- 1 的共表达强(大约 8- 至 10-倍) 增强低氧细胞中HIF-1 α 的转录效率。这些辅激活蛋白也被增加到小于正常含氧量条件下 GAL4/HIF 1-826的转录活性程度。CBP或 SRC- 1都不能单独增强GAL4 DBD的转录活性 (没有给出数据)。

GAL4/HIF 71-826, 其缺失HIF-1 α 的bHLH结构域 (SEQ ID NO: 11 给出HIF-1 α /71-826的氨基酸序列), 诱导的相对荧光活性超过背景水平大约3.5倍(图11A)。在共表达的CBP或 SRC-1的存在下,与在没有外源辅激活蛋白存在下低氧下观察到的活性相比,低氧条件下 GAL4/HIF 71-826 分别将荧光素酶活性诱导高30- 和34-倍的水平。

我们接着检验了CBP和 SRC-1对GAL4融合蛋白的活性的影响,所述融合蛋白包含C-末端连接HIF-1 α 的DNA结合和二聚合作用结构域的序列。GAL4/HIF526-826单独产生低氧-诱导激活响应,与该HIF-1 α 片段中存在两个不同的反式激活结构域完全一致,所述两个不同的反式激活结构域分别是有花纹的N-TAD 和 C-TAD,见图11A, 它们当与 GAL4 DBD融合时以低氧-依赖性方式起作用 (Jiang 等 (1997) 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 272, 19253-19260; Pugh等 (1997) 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 11 205-11214)。瞬时表达CBP 或 SRC- 1时, GAL4/HIF 526-826 的转录活性被大大刺激(大约 7- 至 9-

倍), 证明这些辅激活蛋白瞄向HIF-1 α 的碳末端。此外, 这些结果进一步证明CBP 和SRC-1对HIF-1 α 功能的增强效果不依赖于HIF-1 α 的bHLH和PAS 结构域的存在。

为了进一步研究所述辅激活蛋白是否瞄向HIF-1 α 的一个或两个转录激活结构域, 我们下面缺失了残基813-826, 这是一个HIF-1 α 的C-末端反式激活结构域中包含的区并且鉴定为是一个与CBP 相互作用的点(Arany等(1996) 美国国家科学院院刊 93, 1296912973)。令人感兴趣的是, GAL4/HIF 1-813 (SEQ ID NO: 12给出了HIF-1 α /1-813的氨基酸序列)保持了CBP 和 SRC-1超表达显著增强(14-至13-倍)的低氧-诱导响应(图11A), 表明该辅激活蛋白也可以调节HIF-1 α 的N-末端反式激活结构域的低氧-依赖性功能。

以此为背景, 我们有兴趣检验HIF-1 α 的各个反式激活结构域的调节性质。如图11 A所示, GAL4/HIF 531-584 (SEQ ID NO: 13给出了HIF-1 α /531-584 的氨基酸序列), 一种覆盖HIF-1 α 的N-末端反式激活结构域的嵌合蛋白, 表现出低氧-依赖性报道基因活性的诱导, 尽管比覆盖两个反式激活结构域的构建体的效率低。但是, CBP存在下, 在低氧细胞中发现11-倍报道基因活性刺激, SRC-1 的共表达在相同条件下只稍微(1.5-倍)增强GAL4/HIF 531-584的活性。

我们接着检验了携带N-末端反式激活结构域和一种提出作为抑制序列起作用的结构的GAL4/HIF 526-641 的反式激活能力(Jiang等, 上文)。与GAL4/HIF 531-584 相比, 该嵌合蛋白的转录活性被大大降低, 而且表现出CBP 和SRC-1对其反式激活功能的影响完全消除(图11A), 表明在残基584和 641 之间包含一个抑制区, 其可以在一定的还没有鉴定的条件下服务于调节HIF-1 α 功能, 或者, 该N-末端反式激活结构域与该序列的融合当在该全长蛋白质之外表达时产生错折叠结构域。

相比之下, 包含HIF-1 α 的羧基-末端反式激活结构域, GAL4/HIF 776-826的融合蛋白 (SEQ ID NO: 14给出HIF-1 α /776-826的氨基酸序列), 产生非常适度的(大约 2-倍)低氧-依赖性诱导响应。

但是, 在CBP (29-倍增加)或 SRC- 1 (I 7-被增加)存在下, 其转录活性被显著增强。缺失13个最C-末端氨基酸时, 不管存在不存在辅激活蛋白, GAL4/HIF 776-813 (SEQ IID NO: 15给出HIF-1 α /776-813的氨基酸序列)的基础活性和可诱导性质都完全被取消 (图11A)。

总之, 这些结果提示 (i) CBP通过瞄向HIF-1 α 的反式激活结构域而介导HIF-1 α 的低氧-诱导转录激活, 而 SRC-1看起来主要通过该受体的C-末端反式激活结构域施加其作用; 和 (ii) HIF-1 α 的13个最C-末端氨基酸对于CBP或SRC-1刺激C-末端反式激活结构域是决定性的。但是, 在全长蛋白质中, 该C-末端蛋白质在决定CBP或SRC-1存在下低氧-依赖性功能活性中只起着次要部分作用。

因为HIF-1 α 的功能配偶体因子Arnt最近被证明与CBP/p300相互作用 (Kobayashi 等 (1997) 生物化学杂志 (J. Biochem.) 122, 703-710), 我们也检验了RC-1是否可能与Arnt功能上相互作用。在正常含氧量细胞中, Arnt作为组成型活性转录因子对E box-驱动的启动子作用。与CBP或SRC-1一起, 我们在COS7细胞中瞬时表达与GAL4 DBD融合的Arnt together with either CBP or SRC- 1。在这些实验中我们发现GAL4/Arnt 128-774对报道基因的组成型激活被CBP or SRC- 1的共表达进一步有效增强 (图11B)。缺失Arnt的C-末端反式激活结构域 (图11B图示说明) 完全破坏了这些辅激活蛋白对GAL4/Arnt 128-603 的转录的作用 (Fig. 11B)。这些发现提示HIF-1 α 杂二聚体的亚基, HIF-1 α 和Arnt, 独立地与CBP和 SRC- 1相互作用。令人感兴趣的是, 尽管Arnt与CBP和SRC-1组成型相互作用, 但是HIF-1 α -Arnt杂二聚体复合物与CBP或SRC-1的功能联系是低氧依赖性的。因此, 与HIF-1 α 的二聚合作用看起来将低氧-依赖性调节施与Arnt与这些辅激活蛋白功能上相互作用的能力。为了进一步验证该问题, 我们分析了正常含氧量下HIF-1 α 的超表达对GAL4/Arnt融合蛋白的活性的影响。当

与单独用GAL4融合蛋白转染的细胞相比时,用HIF-1 α 和GAL4/Arnt 128-774 共转染COS7细胞导致报道基因大约4-倍的激活(图11C),可能由于正常含氧量下细胞核中已经存在少量的HIF-1 α 。但是, HIF-1 α 与CBP或 SRC-1的共表达完全破坏了报道基因的组成型激活(图11C)。该效果与两种辅激活蛋白中的一种存在时用GAL4/Arnt 128-603观察到的不能辨别(图11B)。但是该缺失的突变体, 当与HIF-1 α 共转染时又导致大约5-倍刺激的报道基因活性(图11C), 与其通过PAS结构域与HIF-1 α 功能上相互作用的能力相一致。这些结果与与HIF-1 α 的二聚合作用减弱Arnt与 CBP或 SRC-1功能性相互作用的能力的模型相吻合。但是, 该推导的HIF-1 α 的负调节作用的机理需要更进一步研究。

12. SRC-1 和 CBP 协同作用增强 HIF-1 α -依赖性转录

CBP 或 SRC-1增强HIF-1 α 的转录活性的能力促使我们研究两个辅激活蛋白的共表达对HIF-1 α 功能的影响。我们首先研究了SRC-1和 CBP分别的瞬时表达和相互之间组合瞬时表达对最小低氧响应元件驱动的报道基因的HIF-1 α 的低氧-依赖性激活的影响。如上面 9A和 2B所示, COS7 和 293 细胞中SRC-1 对该报道基因的HIF-1 α -依赖性激活的影响分别是严格剂量依赖性的。例如, 在低SRC-1表达载体浓度下(0.75 μ g), 没有检测到对该报道基因的HIF-1 α -依赖性激活的显著影响(图9A; 9B; 12A)。以类似方式, 相同低浓度的CBP表达载体不产生增强的HIF-1 α 的反式激活功能(图 12A)。在这些条件下, 发现了这些报道基因的不好的低氧-依赖性诱导性。但是, 在分别不得到显著效果的剂量下瞬时表达SRC-1和 CBP 时可以重新恢复有效的低氧-依赖性激活响应(图12A), 表明这两个辅激活蛋白之间在增强HIF-1 α 功能方面具有非常强的协同性。

为了进一步确证该协同效果, 我们下面检验了多种GAL4 DBD 融

合蛋白的反式转录能力,所述融合蛋白包含HIF-1 α 的不同亚区。低浓度的 SRC-1和CBP产生合适的跨越缺失N-末端b HLH结构域的HIF-1 α 的GAL4/HIF 71-826的转录激活的刺激(图12B)。相反, SRC-1和 CBP的共表达在低氧细胞中产生强的增强的GAL4/HIF 71-826介导的激活响应。该效果超过相对在单独CBP 或 SRC-1存在下检测到的效果的加和,并且也使用GAL4/HIF 526-826融合蛋白进行了观察,所述融合蛋白包含HIF-1 α 的N-末端和C-末端反式激活结构域两者(图12B)。此外,低浓度的CBP 和 SRC-1的共表达通过GAL4/HIF 531-584 和 GAL4/HIF 776-826中分别包含的HIF-1 α 的各反式激活结构域有效刺激低氧-诱导转录激活。这些结果与证明HIF-1 α 的两个反式激活结构域独立地可以与CBP 或 SRC-1相互作用的数据很好地一致(图11A)。这些数据还与这样的想法相一致,即CBP和 SRC-1相互之间组成型相互作用,并且,与类固醇激素受体家族成员的转录激活的机理类似,在低氧细胞中募集两种辅激活蛋白对于触发HIF-1 α 的完全活性可能是必需的。还要确定这两类对HIF-1 α 的辅激活蛋白的募集是否同时发生或者以暂时被调节方式发生。此外,到目前为止还不清楚CBP, SRC-1或者两者在低氧激活时是否提供与HIF-1 α 的激活结构域的物理接触点。令人感兴趣的是,当被分析的GAL4-HIF-1 α 融合蛋白中包含HIF-1 α 的两个反式激活结构域时,HIF-1 α 和这两个辅激活蛋白之间的功能相互作用是协同的。相反,在SRC-1 和 CBP两者存在下,覆盖分离的反式激活结构域的GAL4融合蛋白表现出调节的加和模式,强有力地提示这两个辅激活蛋白的协同调节可能需要HIF-1 α 的两个反式激活结构域的存在和完整性。

CBP和 p300 是非常相关的蛋白质,它们表现出非常强的序列相似性和它们作为辅激活蛋白作用的相似功能(Arany等(1994) Cell 77, 799-800)。与 CBP类似,在SRC-1存在下,p300增强通过包含HIF-1 α 的一个或两个反式激活结构域的GAL4 融合蛋白的报道基因的低氧-依赖性转录激活(图12C)。如在使用CBP的实验中观察到的(图12B),CBP/p300 和 SRC-1类辅激活蛋白一起产生更合适的(3- 至 4-倍)

位于HIF-1 α 的残基531 和 584之间的N-末端反式激活结构域的低氧激活(图12C), 而在 SRC-1存在下, CBP或 p300 通过HIF-1 α 的C-末端反式激活结构域更有效地刺激 (大约11 -倍)低氧激活 (图12C)。

尽管CBP/p300 类辅激活蛋白作用的机理还不十分清楚, 最近的发现提示这些蛋白质不只是通过作为DNA结合因子和转录引发因子之间的简单的接合体起作用而且还通过携带固有的组蛋白酰基转移酶活性而对转录调节起作用, 连接它们调节染色质结构和/或功能 (Korzus 等 (1998) Science 279, 703-707)。为了研究p300的酰基转移酶活性在支持HIF-1 α -依赖性转录中的有效作用, 我们用p300 缺失突变体, p300 Δ HAT, 转染COS7 细胞, 所述突变体缺失位于该蛋白质中心的组蛋白酰基转移酶(HAT)结构域 (在图12C右栏图示表示)。不存在 SRC-1下, p300 Δ HAT 的瞬时表达导致只有非常合适 (2-倍) 的包含HIF-1 α 的N-末端反式激活结构域的GAL4/HIF 531-584产生的低氧-依赖性激活响应的刺激, 而其对覆盖最小C-末端激活结构域的GAL4/HIF 776-826的低氧-诱导转录活性不产生显著影响(图12C)。SRC-1的存在下, p300 Δ HAT 增强报道基因活性, 最特别是当在低氧细胞中与包含HIF-1 α 的C-末端激活结构域的GAL4/HIF776-826一起共表达时。但是, p300 Δ HAT 在产生该响应中比野生型p300 效率小大约2-倍 (图12C), 表明p300的酰基转移酶催化活性可能贡献于引发HIF-1 α -介导的转录激活响应的完全活性。但是, 观察到在增强HIF-1 α 的激活效率中CBP/p300 和 SRC-1之间的协同性, 和SRC-1也具有固有的组蛋白酰基转移酶活性的事实 (Spencer 等 (1997) Nature 389, 194-198), 缺失p300的酰基转移酶结构域的效果可能被CBP-相关的蛋白质, 可能是SRC-1本身的相应的活性遮蔽。

13. CBP和 SRC-1存在下Ref-1加强HIF-1 α 功能

细胞核氧化还原调节剂Ref-1已知通过Fos和Jun的保守的半胱氨

酸的还原来稳定AP-1的DNA结合活性。Ref-1是一种双功能酶：它具有氧化还原和内切酶DNA修复活性 (Xanthoudakis等 (1992) ENO J. 11, 3323-3335) 并且涉及低氧条件下基因表达的HIF-1 α -依赖性诱导的正调节 (Huang等 (1996) 生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 271, 32253-32259)。以此为背景, 我们想进一步研究Ref-1对HIF-1 α -依赖性转录激活的效果, 并且检验其对HIF-1 α 与辅激活蛋白CBP和SRC-1的功能相互作用的影响。为了研究HIF-1 α 是否是Ref-1调节的一个靶物, 我们开始使用含有不同的HIF-1 α 的亚片段的不同的GAL4 DBD 融合蛋白。如图 13A所示, Ref-1的瞬时超表达明显促进覆盖HIF-1 α 的两个反式激活结构域的融合蛋白GAL4/HIF 71-826 和 GAL4/HIF 526-826对报道基因表达的低氧诱导。包含HIF-1 α 的N-末端反式激活结构域的GAL4/HIF 531-584的转录激活功能只是非常合适的但是在低氧细胞中Ref-1对其明显刺激, 而 Ref-1 产生更有效的包含C-末端反式激活结构域的GAL4/HIF 776-826对低氧-诱导反式激活的调节 (图13A)。

根据辅激活蛋白CBP和 SRC-1对HIF-1 α 功能的显著增强, 我们接着检验了Ref-1对GAL4-HIF-1 α 融合蛋白结合CBP, SRC-1或者两种蛋白质的转录激活的影响。Ref-1与CBP或 SRC-1的瞬时表达之后, 与存在该融合蛋白和单独的Ref-1获得的结果相比, 试验的GAL4-HIF-1 α 融合蛋白的低氧-诱导转录激活不显著改变(图 13B)。

但是引人注目的是, 包含两个或单个各HIF-1 α 反式激活结构域的所有的融合蛋白的低氧-诱导转录能力在CBP和 SRC-1存在下引人注目地被Ref-1的共表达增强 (10-至53-倍) (图 13B)。在这些条件下, 覆盖N-或C-末端反式激活结构域的融合蛋白分别产生12-或53-倍低氧-依赖性激活响应, 而包含缺失CBP相互作用界面GAL4/HIF 776-813的C-末端反式激活结构域的融合蛋白没有表现出被Ref-1和辅激活蛋白调节。因此, 这些数据表明这两种辅激活蛋白在这些条件下对于Ref-1介导的对HIF-1 α -依赖性转录的影响是有限的。此外,

这些结果清楚地证明N-末端和C-末端反式激活结构域HIF-1 α 两者是Ref-1调节的靶物,意味着Ref-1与CBP和SRC-1类的转录辅激活蛋白一起在HIF-1 α 功能调节中起着关键作用。此外,这是代表Ref-1调节的靶物的反式激活结构域的第一个实例,并且,相反地,这些数据代表在哺乳动物细胞中鉴定的HIF-1 α 反式激活结构域的非共价蛋白质修饰剂的第一个实例。

Ref-1激活HIF-1 α 的准确机理是未知的。令人感兴趣的是,一种GFP标记的Ref-1融合蛋白在正常含氧量和低氧条件下专一定位于细胞核表明,HIF-1 α 的核转位对于与Ref-1的功能相互作用是必需的。该氧化还原蛋白已经证明体外与Jun形成复合物(Xanthoudakis等(1994)美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 91, 2327)。为了进一步研究Ref-1是否可以与HIF-1 α 相互作用,我们尝试通过使用一种交联剂例如将半胱氨酸巯基氧化为二硫键的胍来捕获这种相互作用。使用GST-标记的纯化的Ref-1进行一系列实验。[35S]甲硫氨酸-标记的体外翻译的GAL4/HIF1-826在没有胍存在下与GST/Ref-1一起温育。发现GAL4/HIF 1-826微弱结合GST/Ref-1和稳定Ref-1和GAL4/HIF之间的这种相互作用的交联剂。当在没有GST/Ref-1存在下单独与抗-GST亲和凝胶温育时或者其与纯化的GST温育时没有发现[35S]甲硫氨酸-标记的GAL4/HIF的结合,表明没有显著的背景结合。

接着,我们用[35S]甲硫氨酸-标记的体外翻译的GAL4/HIF776-826和GAL4/HIF 531-584试验了一系列推翻(pull-down)实验。GAL4/HIF 531-584结合GST/Ref1,并且没有观察到胍的作用,与HIF-1 α 的N-末端反式激活结构域中不存在半胱氨酸残基相一致。也检测到GAL4/HIF 726-826和GST/Ref-1之间的相互作用,并且该相互作用在胍的存在下有所增强。与该发现很好地一致,即C-TAD包含两个半胱氨酸残基。在存在或不存在胍时观察到该标记

的蛋白质对GST的低水平的背景结合。免疫印迹分析证实单独GST/Ref-1或单独的GST的输入浓度是近似的。

上面的实验证实Ref-1促进CBP和SRC-1辅激活蛋白两者对HIF-1 α 的低氧-诱导启动子激活的影响。此外,Ref-1与不同的HIF-1 α 的N-和C-末端反式激活结构域发生功能性和物理性相互作用。但是,只有HIF-1 α 的C-末端而不是N-末端激活结构域包含半胱氨酸残基,通过该残基发生Ref-1调节(Xanthoudakis等(1992) ENMO J. 11, 3323-3335)。这些数据表明辅助因子,可能是一种辅激活蛋白,可以介导与至少HIF-1 α 的N-末端反式激活结构域的相互作用。

材料和方法

(a) 试剂

在巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子控制下,编码修饰的并且高度发色形式的GFP的pCMX-SAH/Y145F表达载体是Dr. Kazuhiko Umesono(东京大学,日本)馈赠的礼物。该人源化GFP(SAH/Y145F)包含一个S65A突变,其给该蛋白质带来波长位移和温度抗性以及Y145P取代,提高GFP的分子内稳定性。表达全长小鼠CBP的pRc/RSV-mCBP-HA构建体是Dr. Richard H. Goodman(Vollum Institute, Oregon)馈赠的礼物。通过从pGEX-4T3-HIF-1 α 切割HIF-1 α 编码区作为BamHI/NotI片段(用Klenow聚合酶补平NotI位点)并且符合读框地将其连接到BamHI/NheI打开的pCMX-SAH/Y145F中,其中用Klenow将NheI位点平端,产生表达全长HIF-1 α 的GFP-融合物的载体。通过将HIF-1 α 的BamHI/SpeI片段插入到BamHI/NheI消化的pCMX-SAH/Y145F中来装配缺失突变体HIF-1 α /1-652。通过PCR使用Pfu DNA聚合酶(Stratagene)与携带BamHI或NheI末端的引物对一起通过扩增等价DNA序列产生编码HIF-1 α 的亚片段(相应于氨基酸331-641, 526-641,和526-826)的GFP融合物。将得到

的产物插入 *Bam*HI/*Nhe* I 打开的 pCMX-SAH/Y1 45F 中。从相应的细菌 GST 融合物表达载体切割下携带氨基末端序列 HIF-1 α (1-74, 1-245, 1-330) 的 GFP 融合物并且符合读框地插入 pCMX-SAH/Y1 45F 的 *Bam*HI/*Nhe* I 位点 (*Nhe*I 平端)。通过通过 *Pst*I 消化裂解 C-末端 13 个氨基酸来产生末端是氨基酸 813 的 GFP-HIF-1 α 融合蛋白。通过将 HIF-1 α 插入物裂解为 *Bam*HI/*Nhe* I 片段并且将它们再连接到 pCMX 表达载体中来组装相应的 GAL4 DNA-结合结构域融合蛋白。

通过重叠 PCR (Ausubel 等, 1994) 进行 C-末端 NLS 的定点诱变, 其中期望的突变 (密码子 719 AAG $\rightarrow$ ACA) 被引入到一个 PCR 产物中, 然后作为 *Eco*RI-*Pst*I 亚片段被插入 pGFP-HIF-1 α /526-826 中。携带 K719T 突变的全长 HIF-1 α 的 GFP 融合物然后通过将 HIF-1 α 的氨基末端 *Bam*HI-SpeI 片段插入到 pGFP-HIF-1 α /526-826 K719T 中来组装。使用特异性寡核苷酸的 PCR-为基础的诱变被用来产生对 N-末端 NLS 基元的突变。通过对插入物测序证实 PCR 反应的保真度和构建物的鉴定。

(b) 细胞培养和转染

我们在补充有 10% 胎牛血清加青霉素 (50 IU/ml) 和链霉素 (50 μ g/ml) 的 Dulbecco's 极限必需培养基 (DMEM) 中常规维持 COS7 细胞 (来自 ATCC)。对于分析活细胞中 HIF-1 α 的核转位, 我们在 COS7 细胞中瞬时表达 GFP-标记的 HIF-1 α 及其各种突变体质粒。在 6 厘米直径塑料皿中在包被硅烷的盖玻片上培养细胞, 并且在转染之前将培养基变成没有酚红的 OPTI-MEM 培养基 (Life Technologies, Inc.)。将含有 6 μ g 用于 GFP 标记的 HIF-1 α 表达质粒及其各种突变体的质粒混合物与 12 μ L 的 TransIT-LT 1 试剂 (Panvera Corp., Madison, WI) 混合并且加入该培养物中。培养 6 小时之后, 用含有 10% FCS 的 DMEM 置换培养基。24 小时后用 1% O₂, 100 μ M 2, 2'-联吡啶或 100 μ M CoCl₂ 诱导或者只用赋形剂处理。

在共转染测试中分析GFP 和 GAL4 融合构建体的转录活性, 其中效应基因质粒 (0.2 μ g/ 30-mm 皿) 和报道基因 (1.5 μ g/ 30-mm 皿) 一起引入到COS7 或 HeLa 细胞中。在胸苷激酶最小启动子和分别5个或3个GAL4或HIF-响应元件的拷贝的控制下, 报道基因质粒编码萤火虫荧光素酶基因。

(c) 免疫细胞化学分析

用全长HIF- 1 α (pCMV-HIF- 1 α) 或者与GAL4 DNA结合域融合的HIF- 1 α (pCMX-GAL4-HIF-1 α) 的表达质粒瞬时转染在包被纤连蛋白的盖玻片上培养的COS7 细胞。各种处理后, 室温下用4%的低聚甲醛的PBS溶液固定细胞30分钟。使用抗-HIF- 1 α 抗血清 (Kallio 等 (1997) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 94, 5667-5672) 或者抗-GAL4-DBD 抗血清 (Upstate Biotechnology), 和合适的生物素化-第二抗体和链抗生物素蛋白-偶联的异硫氰酸荧光素或德克萨斯红 (Amersham) 进行细胞的免疫染色。在载玻片上安装盖玻片并且进行显微镜分析。

(d) 目测活细胞中GFP-标记的蛋白质的细胞内运输

在转染之后24和72小时之间以可检测水平表达瞬时表达的GFP。通常情况下, 转染之后48小时将细胞用于进一步的实验。各种处理之后, 使用Zeiss Axiovert 135 附有恒温箱并且装备有加热层, FITC-过滤装置和带有从Gixenon bumer (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, 德国) 购得的发光源的落射荧光显微镜观察细胞。使用Kodak Ektachrome 400 照相, 并且根据 Ylikomi 等 ((1992) EMBOJ. 11, 3681-3694) 的描述半定量评价GFP-标记的蛋白的亚细胞定位。简要地说, 不知内情的观察者进行GFP-标记的蛋白的亚细

胞定位,检测到GFP荧光的大约有200个细胞。将GFP 荧光阳性细胞分为四种不同类别:对于细胞质优势荧光, $N < C$; $N = C$, 细胞质和细胞核区室中具有相同的荧光分布的细胞;对于细胞核优势荧光, $N > C$;对于专一细胞核荧光,为N类。

(e)免疫印迹和检测

对于检测HIF- 1 α 融合蛋白表达,基本上根据描述过的(Kallio等(1997)美国国家科学院院刊94, 5667-5672) 制备全细胞提取物。简要地说,在TEN缓冲液(40 mM Tris-HCl, pH 7.9; 10 mM EDTA; 150 mM NaCl)中收获细胞。在液氮中冷冻细胞沉淀并且通过再悬浮于80 μ l的细胞抽提缓冲液(10 mM Hepes, pH 7.9; 400 mM NaCl; 0.1mM EDTA; 5% (v/v) 甘油; 1mM二硫苏糖醇; 1 mM 苯基甲基磺酰氟)中,接着以最大速率离心30分钟,解冻。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳之后将50 μ g全细胞蛋白质印迹到硝基纤维素滤纸上并且在5%脱脂奶的PBS溶液中封闭过夜。使用抗-HIF- 1 α 抗血清作为第一抗体,在含有1%脱脂奶的PBS溶液中以1:500 稀释 2小时。洗涤后,将在PBS /1%脱脂奶中以1:750稀释的抗-兔IgG- 辣根过氧化物酶偶联物 (AmershaTn)用作第二抗体。用PBS充分洗涤之后,根据厂商说明使用增强的化学发光(Amersham) 目测这些复合物。

表 I

GFP-HIF-1 α 嵌合体的亚细胞分布。用指定的融合构建体双份转染细胞,并且在转染24小时之后在显微镜观察之前用100 μ M的 2,2'-联吡啶(dipyridyl)或者只用赋形剂诱导6小时,并计数细胞,将细胞分为四类: N, 仅含有核荧光的细胞; $N > C$, 核荧光比胞质荧光占优势的细胞; $N = C$, 荧光分布相同的细胞; 和 $N < C$, 细胞质中荧光强度超过细胞核中的荧光强度的细胞。共对200至300 个细胞分析了荧光分布,表中指明了属于各类分类的细胞百分比。

	正常含氧量				低氧(联吡啶)			
	N	N>C	N=C	N<C	N	N>C	N=C	N<C
GFP	0	0	100	0	0	0	100	0
GFP-HIF-1 α	8	27	65	0	90	7	3	0
GFP-HIF-1 α /1-74	69	20	11	0	56	35	9	0
GFP-HIF-1 α /1-245	36	38	26	0	31	43	26	0
GFP-HIF-1 α /1-330	0	9	91	0	0	5	95	0
GFP-HIF-1 α /Δ178-390	57	23	20	0	42	29	29	0
GFP-HIF-1 α /331-641	0	0	100	0	0	0	100	0
GFP-HIF-1 α /526-641	0	0	100	0	0	0	100	0
GFP-HIF-1 α /1-652	0	0	0	100	0	0	0	100
GFP-HIF-1 α /526-826	100	0	0	0	100	0	0	0
GFP-HIF-1 α /526-813	90	10	0	0	83	11	3	0

表II

NLS基元中携带点突变的GFP-HIF-1 α 嵌合体的亚细胞分布,用指定的融合构建体双份转染细胞,并且在转染24小时之后在显微镜观察之前用100 μ M的 2,2'-联吡啶或者只用赋形剂诱导6小时,并计数细胞。

将细胞分为表I列出的四类。共对200至300 个细胞分析了荧光分布，表中指明了属于各类分类的细胞百分比。

	正常含氧量				低氧(联吡啶)			
	N	N>C	N=C	N<C	N	N>C	N=C	N<C
GFP-HIF-1 α K719T	0	0	4	96	0	0	19	81
GFP-HIF-1 α /R18A	37	15	48	0	82	6	12	0
GFP-HIF-1 α R17G/R18G	50	24	26	0	84	8	18	0
GFP-HIF-1 α / Δ 178-390K719T	0	0	18	82	0	0	15	85
GFP-HIF-1 α / 526-826K719T	26	24	50	0	15	14	71	0

序列表

<110> Pharmacia & Upjohn

<120> 蛋白质变体

<130> 1848

<140>

<141>

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 826

<212> PRT

<213> 人

<300>

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

<304> 92

<306> 5510-5514

<308> GenBank U22431

<309> 1995-06-28

<400> 1

```

Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
 1              5              10              15

Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
      20              25              30

Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
 35              40              45

Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
 50              55              60

Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
 65              70              75              80

Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
      85              90              95

Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
 100              105              110

Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
 115              120              125

Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
 130              135              140

Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
 145              150              155              160

Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
      165              170              175

```

Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
 180 185 190
 His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
 195 200 205
 Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
 210 215 220
 Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
 225 230 235 240
 Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp
 245 250 255
 Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly
 260 265 270
 Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr
 275 280 285
 Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln
 290 295 300
 Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln
 305 310 315 320
 Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val
 325 330 335
 Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe
 340 345 350
 Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp
 355 360 365
 Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser
 370 375 380
 Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu
 385 390 395 400
 Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn
 405 410 415
 Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn
 420 425 430
 Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu
 435 440 445
 Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser
 450 455 460
 Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro
 465 470 475 480
 Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp
 485 490 495
 Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu
 500 505 510

```

Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val
515                    520                    525

Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr
530                    535                    540

Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu
545                    550                    555                    560

Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser
565                    570                    575

Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser
580                    585                    590

Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln
595                    600                    605

Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu
610                    615                    620

Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala
625                    630                    635                    640

Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser
645                    650                    655

Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala
660                    665                    670

Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro
675                    680                    685

Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu
690                    695                    700

Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg
705                    710                    715                    720

Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr
725                    730                    735

Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp
740                    745                    750

Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln
755                    760                    765

Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly
770                    775                    780

Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys
785                    790                    795                    800

Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu
805                    810                    815

Glu Leu Leu Arg Ala Leu Asp Gln Val Asn
820                    825

```

<210> 2

<211> 74

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 HIF-1 α 的亚结构域 1-74

<400> 2

Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
1 5 10 15Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
20 25 30Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
35 40 45Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
50 55 60Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp
65 70

<210> 3

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 HIF-1 α 的亚结构域 1-245

<400> 3

Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
1 5 10 15Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
20 25 30Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
35 40 45Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
50 55 60Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
65 70 75 80Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
85 90 95Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
100 105 110Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
115 120 125Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
130 135 140

```

Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
145                      150                      155                      160
Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
                      165                      170                      175
Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
                      180                      185                      190
His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
                      195                      200                      205
Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
                      210                      215                      220
Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
225                      230                      235                      240
Thr Phe Leu Ser Arg
                      245

```

```

<210> 4
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 人工序列的描述: 人 HIF-1  $\alpha$  的亚结构域 1-330

```

```

<400> 4
Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
1                      5                      10                      15
Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
                      20                      25                      30
Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
                      35                      40                      45
Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
                      50                      55                      60
Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
                      65                      70                      75                      80
Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
                      85                      90                      95
Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
                      100                      105                      110
Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
                      115                      120                      125
Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
                      130                      135                      140
Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
145                      150                      155                      160

```

Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
 165 170 175
 Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
 180 185 190
 His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
 195 200 205
 Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
 210 215 220
 Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
 225 230 235 240
 Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp
 245 250 255
 Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly
 260 265 270
 Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr
 275 280 285
 Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln
 290 295 300
 Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln
 305 310 315 320
 Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser
 325 330

<210> 5

<211> 652

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 HIF-1 α 的亚结构域 1-652

<400> 5

Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
 20 25 30
 Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
 35 40 45
 Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
 50 55 60
 Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
 65 70 75 80
 Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
 85 90 95

Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
 100 105 110
 Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
 115 120 125
 Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
 130 135 140
 Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
 145 150 155 160
 Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
 165 170 175
 Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
 180 185 190
 His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
 195 200 205
 Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
 210 215 220
 Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
 225 230 235 240
 Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp
 245 250 255
 Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly
 260 265 270
 Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr
 275 280 285
 Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln
 290 295 300
 Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln
 305 310 315 320
 Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val
 325 330 335
 Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe
 340 345 350
 Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp
 355 360 365
 Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser
 370 375 380
 Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu
 385 390 395 400
 Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn
 405 410 415
 Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn
 420 425 430

Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu
 435 440 445
 Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser
 450 455 460
 Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro
 465 470 475 480
 Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp
 485 490 495
 Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu
 500 505 510
 Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val
 515 520 525
 Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr
 530 535 540
 Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu
 545 550 555 560
 Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser
 565 570 575
 Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser
 580 585 590
 Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln
 595 600 605
 Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu
 610 615 620
 Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala
 625 630 635 640
 Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr
 645 650

<210> 6

<211> 613

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
 20 25 30
 Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
 35 40 45
 Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
 50 55 60

Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
 65 70 75 80
 Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
 85 90 95
 Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
 100 105 110
 Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
 115 120 125
 Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
 130 135 140
 Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
 145 150 155 160
 Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
 165 170 175
 Ser Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu Ala Pro Ala Ala Gly
 180 185 190
 Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn Asp Thr Glu Thr Asp
 195 200 205
 Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn Asp Val Met Leu Pro
 210 215 220
 Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu Ala Met Ser Pro Leu
 225 230 235 240
 Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser Ser Ala Asp Pro Ala
 245 250 255
 Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro Asn Pro Glu Ser Leu
 260 265 270
 Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp Gln Thr Pro Ser Pro
 275 280 285
 Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu Pro Asn Ser Pro Ser
 290 295 300
 Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val Asn Glu Phe Lys Leu
 305 310 315 320
 Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr Glu Ala Lys Asn Pro
 325 330 335
 Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr
 340 345 350
 Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser Phe Asp Gln Leu Ser
 355 360 365
 Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser Ala Ser Pro Gln Ser
 370 375 380
 Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln Glu Pro Thr Ala Asn
 385 390 395 400

Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu Lys Thr Val Thr Lys
405 410 415

Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala Ser Pro Ser Pro Thr
420 425 430

His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser Ser Pro Tyr Arg Asp
435 440 445

Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala Gly Lys Gly Val Ile
450 455 460

Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro Asn Val Leu Ser Val
465 470 475 480

Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu Glu Leu Asn Pro Lys
485 490 495

Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg Lys Met Glu His Asp
500 505 510

Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr Leu Leu Gln Gln Pro
515 520 525

Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp Lys Arg Val Lys Gly
530 535 540

Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln Lys Thr Ile Ile Leu
545 550 555 560

Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly Gln Ser Met Asp Glu
565 570 575

Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys Glu Val Asn Ala Pro
580 585 590

Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu Glu Leu Leu Arg Ala
595 600 605

Leu Asp Gln Val Asn
610

<210> 7

<211> 311

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 HIF-1 α 的亚结构域 331-641

<400> 7

Gln Pro Gln Cys Ile Val Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile
1 5 10 15

Gln His Asp Leu Ile Phe Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys
20 25 30

Pro Val Glu Ser Ser Asp Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val
35 40 45

Glu Ser Glu Asp Thr Ser Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro
 50 55 60
 Asp Ala Leu Thr Leu Leu Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser
 65 70 75 80
 Leu Asp Phe Gly Ser Asn Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu
 85 90 95
 Glu Val Pro Leu Tyr Asn Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys
 100 105 110
 Leu Gln Asn Ile Asn Leu Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr
 115 120 125
 Pro Lys Pro Leu Arg Ser Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val
 130 135 140
 Ala Leu Lys Leu Glu Pro Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr
 145 150 155 160
 Met Pro Gln Ile Gln Asp Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr
 165 170 175
 Arg Gln Ser Ser Pro Glu Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr
 180 185 190
 Val Asp Ser Asp Met Val Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys
 195 200 205
 Leu Phe Ala Glu Asp Thr Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp
 210 215 220
 Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Leu Arg Ser Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser
 245 250 255
 Ser Ala Ser Pro Glu Ser Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe
 260 265 270
 Gln Gln Thr Gln Ile Gln Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr
 275 280 285
 Ala Thr Thr Asp Glu Leu Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp
 290 295 300
 Ile Lys Ile Leu Ile Ala Ser
 305 310

<210> 8

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 HIF-1 α 的亚结构域 526-641

<400> 8

```

Asp Met Val Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala
 1          5          10          15
Glu Asp Thr Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu
 20          25          30
Asp Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln
 35          40          45
Leu Arg Ser Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser
 50          55          60
Pro Glu Ser Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr
 65          70          75          80
Gln Ile Gln Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr
 85          90          95
Asp Glu Leu Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile
 100         105         110
Leu Ile Ala Ser
 115

```

<210> 9

<211> 288

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 HIF-1 α 的亚结构域 526-813

<400> 9

```

Asp Met Val Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala
 1          5          10          15
Glu Asp Thr Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu
 20          25          30
Asp Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln
 35          40          45
Leu Arg Ser Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser
 50          55          60
Pro Glu Ser Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr
 65          70          75          80
Gln Ile Gln Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr
 85          90          95
Asp Glu Leu Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile
 100         105         110
Leu Ile Ala Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser
 115         120         125
Ala Thr Ser Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro
 130         135         140

```

```

Asn Arg Ala Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro
145                      150                      155                      160

Arg Ser Pro Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val
                      165                      170                      175

Pro Glu Glu Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln
                      180                      185                      190

Arg Lys Arg Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly
                      195                      200                      205

Ile Gly Thr Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser
210                      215                      220

Leu Ser Trp Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly
225                      230                      235                      240

Met Glu Gln Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg
                      245                      250                      255

Leu Leu Gly Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser
260                      265                      270

Tyr Asp Cys Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu
275                      280                      285

```

<210> 10

<211> 301

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 HIF-1 α 的亚结构域 526-826

<400> 10

```

Asp Met Val Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala
1                      5                      10                      15

Glu Asp Thr Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu
20                      25                      30

Asp Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln
35                      40                      45

Leu Arg Ser Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser
50                      55                      60

Pro Glu Ser Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr
65                      70                      75                      80

Gln Ile Gln Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr
85                      90                      95

Asp Glu Leu Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile
100                      105                      110

```

```

Leu Ile Ala Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser
  115                      120                      125
Ala Thr Ser Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro
  130                      135                      140
Asn Arg Ala Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro
  145                      150                      155                      160
Arg Ser Pro Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val
                      165                      170                      175
Pro Glu Glu Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln
                      180                      185                      190
Arg Lys Arg Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly
  195                      200                      205
Ile Gly Thr Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser
  210                      215                      220
Leu Ser Trp Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly
  225                      230                      235                      240
Met Glu Gln Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg
                      245                      250                      255
Leu Leu Gly Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser
                      260                      265                      270
Tyr Asp Cys Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu
  275                      280                      285
Gln Gly Glu Glu Leu Leu Arg Ala Leu Asp Gln Val Asn
  290                      295                      300

```

<210> 11
 <211> 756
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 人 HIF-1 α 的亚结构域 71-826

```

<400> 11
Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile Glu Asp Asp Met Lys Ala
  1                      5                      10                      15
Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu Asp Gly Phe Val Met Val
                      20                      25                      30
Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile Ser Asp Asn Val Asn Lys
  35                      40                      45
Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr Gly His Ser Val Phe Asp
  50                      55                      60
Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met Arg Glu Met Leu Thr His
  65                      70                      75                      80

```

Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu Gln Asn Thr Gln Arg Ser
 85 90 95
 Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr Ser Arg Gly Arg Thr Met
 100 105 110
 Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu His Cys Thr Gly His Ile
 115 120 125
 His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro Gln Cys Gly Tyr Lys Lys
 130 135 140
 Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys Glu Pro Ile Pro His Pro
 145 150 155 160
 Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys Thr Phe Leu Ser Arg His
 165 170 175
 Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp Glu Arg Ile Thr Glu Leu
 180 185 190
 Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr
 195 200 205
 Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr Lys Thr His His Asp Met
 210 215 220
 Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln Tyr Arg Met Leu Ala Lys
 225 230 235 240
 Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln Ala Thr Val Ile Tyr Asn
 245 250 255
 Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val Cys Val Asn Tyr Val Val
 260 265 270
 Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe Ser Leu Gln Gln Thr Glu
 275 280 285
 Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp Met Lys Met Thr Gln Leu
 290 295 300
 Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser Ser Leu Phe Asp Lys Leu
 305 310 315 320
 Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu Ala Pro Ala Ala Gly Asp
 325 330 335
 Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn Asp Thr Glu Thr Asp Asp
 340 345 350
 Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn Asp Val Met Leu Pro Ser
 355 360 365
 Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu Ala Met Ser Pro Leu Pro
 370 375 380
 Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser Ser Ala Asp Pro Ala Leu
 385 390 395 400
 Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro Asn Pro Glu Ser Leu Glu
 405 410 415

Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp Gln Thr Pro Ser Pro Ser
 420 425 430
 Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu Pro Asn Ser Pro Ser Glu
 435 440 445
 Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val Asn Glu Phe Lys Leu Glu
 450 455 460
 Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr Glu Ala Lys Asn Pro Phe
 465 470 475 480
 Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr Ile
 485 490 495
 Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser Phe Asp Gln Leu Ser Pro
 500 505 510
 Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser Ala Ser Pro Gln Ser Thr
 515 520 525
 Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln Glu Pro Thr Ala Asn Ala
 530 535 540
 Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu Lys Thr Val Thr Lys Asp
 545 550 555 560
 Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala Ser Pro Ser Pro Thr His
 565 570 575
 Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser Ser Pro Tyr Arg Asp Thr
 580 585 590
 Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala Gly Lys Gly Val Ile Glu
 595 600 605
 Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro Asn Val Leu Ser Val Ala
 610 615 620
 Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu Glu Leu Asn Pro Lys Ile
 625 630 635 640
 Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg Lys Met Glu His Asp Gly
 645 650 655
 Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr Leu Leu Gln Gln Pro Asp
 660 665 670
 Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp Lys Arg Val Lys Gly Cys
 675 680 685
 Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln Lys Thr Ile Ile Leu Ile
 690 695 700
 Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly Gln Ser Met Asp Glu Ser
 705 710 715 720
 Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys Glu Val Asn Ala Pro Ile
 725 730 735
 Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu Glu Leu Leu Arg Ala Leu
 740 745 750

Asp Glr Val Asn
755

<210> 12

<211> 813

<212> PPT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 HIF-1 α 的亚结构域 1-813

<400> 12

Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
1 5 10 15

Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
20 25 30

Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
35 40 45

Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
50 55 60

Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
65 70 75 80

Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
85 90 95

Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
100 105 110

Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
115 120 125

Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
130 135 140

Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
145 150 155 160

Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
165 170 175

Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
180 185 190

His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
195 200 205

Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
210 215 220

Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
225 230 235 240

Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp
245 250 255

Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly
 260 265 270
 Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr
 275 280 285
 Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln
 290 295 300
 Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln
 305 310 315 320
 Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val
 325 330 335
 Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe
 340 345 350
 Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp
 355 360 365
 Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser
 370 375 380
 Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu
 385 390 395 400
 Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn
 405 410 415
 Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn
 420 425 430
 Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu
 435 440 445
 Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser
 450 455 460
 Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro
 465 470 475 480
 Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp
 485 490 495
 Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu
 500 505 510
 Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val
 515 520 525
 Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr
 530 535 540
 Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu
 545 550 555 560
 Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser
 565 570 575
 Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser
 580 585 590

Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln
 595 600 605
 Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu
 610 615 620
 Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala
 625 630 635 640
 Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser
 645 650 655
 Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala
 660 665 670
 Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro
 675 680 685
 Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu
 690 695 700
 Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg
 705 710 715 720
 Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr
 725 730 735
 Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp
 740 745 750
 Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln
 755 760 765
 Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly
 770 775 780
 Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys
 785 790 795 800
 Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu
 805 810

<210> 13

<211> 54

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 HIF-1 α 的亚结构域 531-584

<400> 13

Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu
 20 25 30
 Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser Phe Asp
 35 40 45

Gln Leu Ser Pro Leu Glu
50

<210> 14
<211> 51
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 HIF-1 α 的亚结构域 776-826

<400> 14

Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly
1 5 10 15

Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln
20 25 30

Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu Glu Leu Leu Arg Ala Leu Asp
35 40 45

Gln Val Asn
50

<210> 15
<211> 38
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 HIF-1 α 的亚结构域 776-813

<400> 15

Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly
1 5 10 15

Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln
20 25 30

Gly Ser Arg Asn Leu Leu
35



图 1

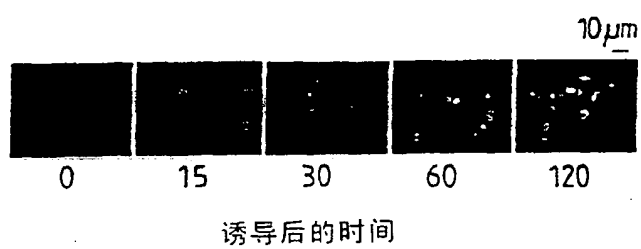


图 2D

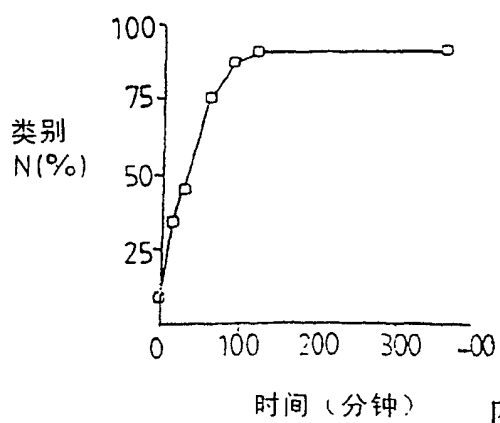


图 2E

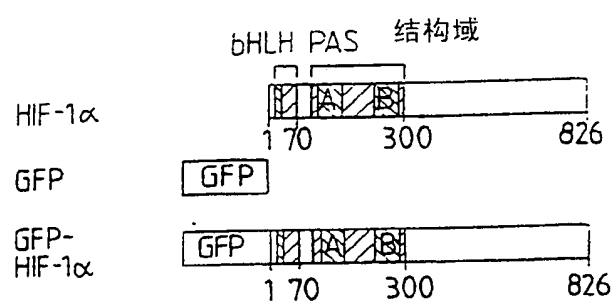


图 2A

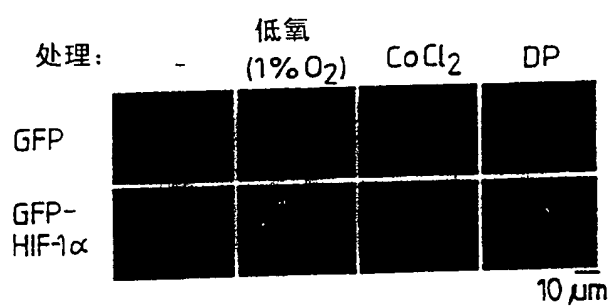


图 2B

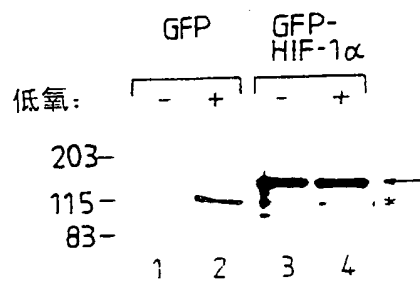
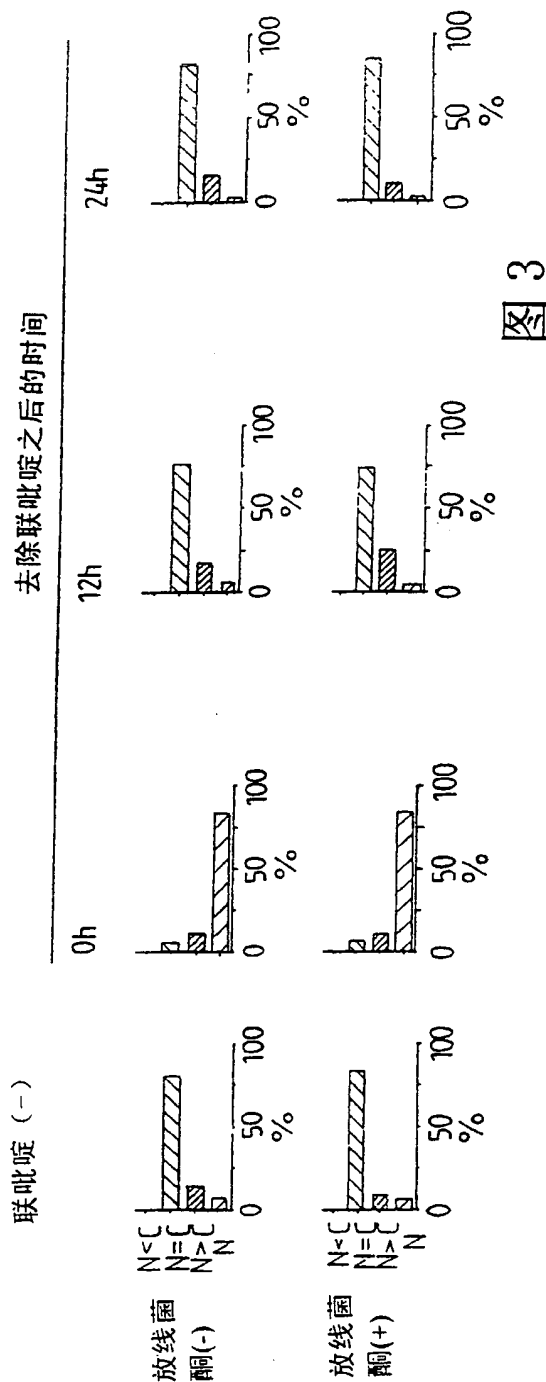
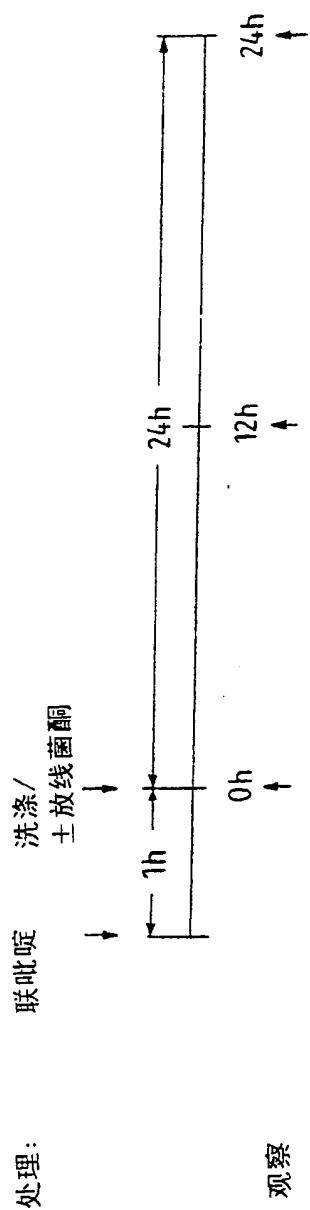


图 2C



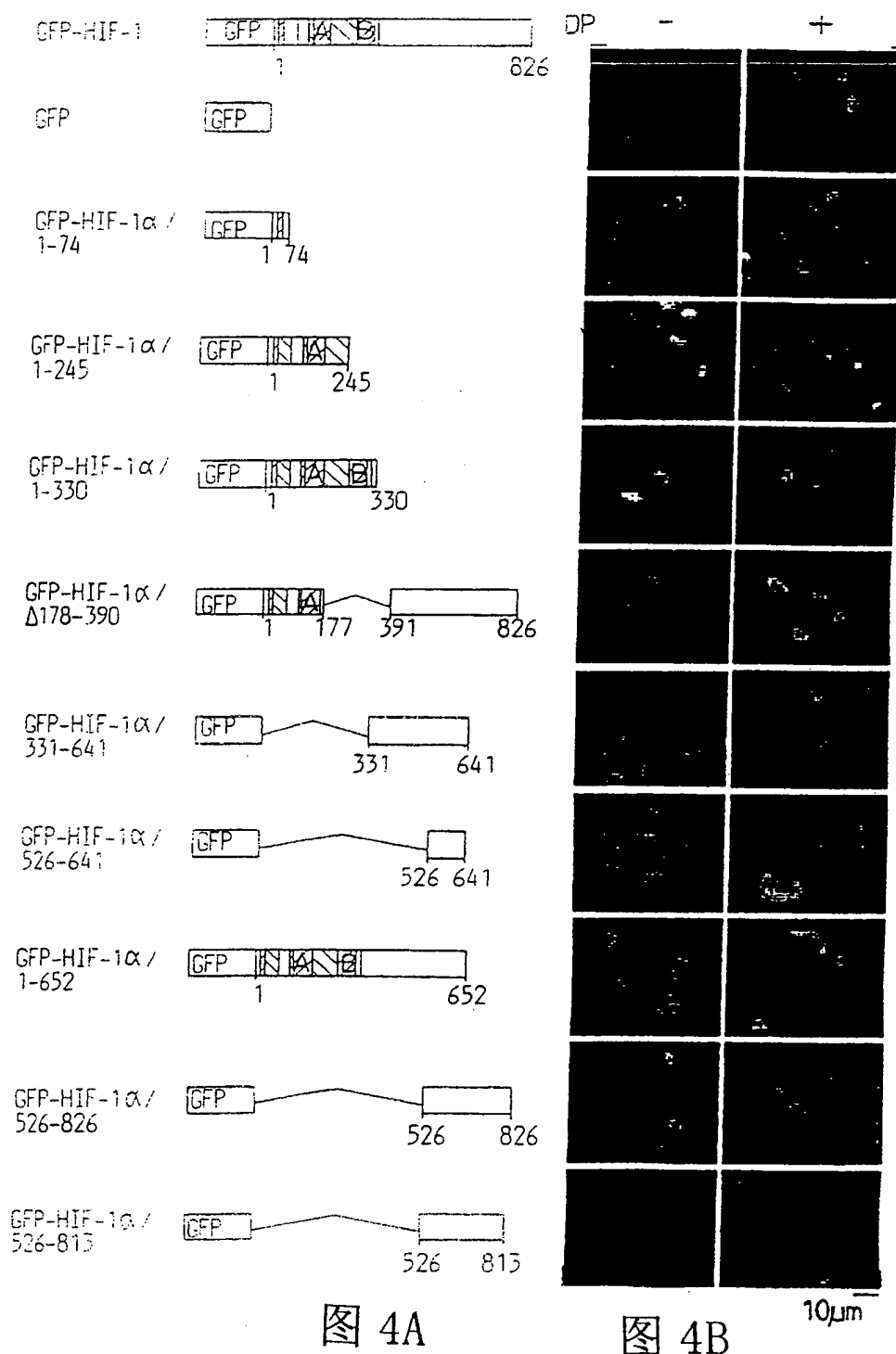


图 4A

图 4B

10 μm

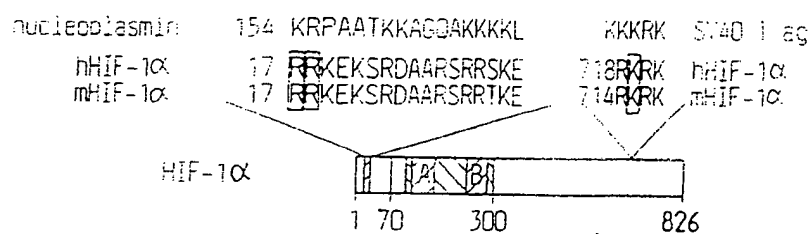


图 5A

DP: - +

GFP-HIF-1 α

GFP-HIF-1 α
K719T

GFP-HIF-1 α
R18A

GFP-HIF-1 α
R17G/R18G

GFP-HIF-1 α /
 Δ 178-390

GFP-HIF-1 α /
 Δ 178-390 K719T

GFP-HIF-1 α /
526-826

GFP-HIF-1 α /
526-826 K719T

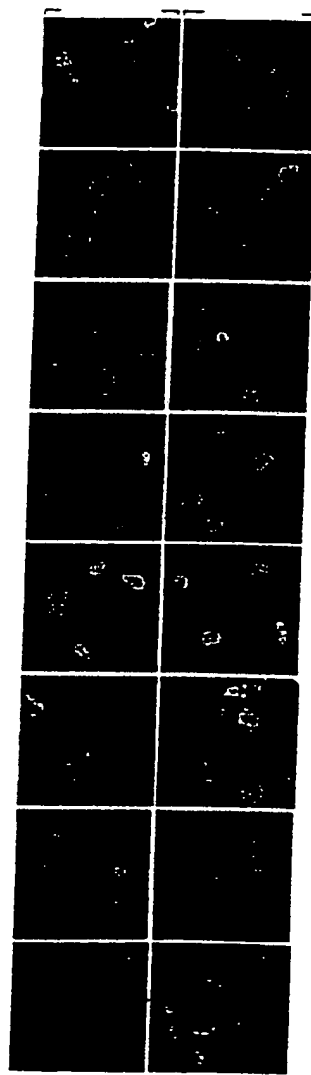
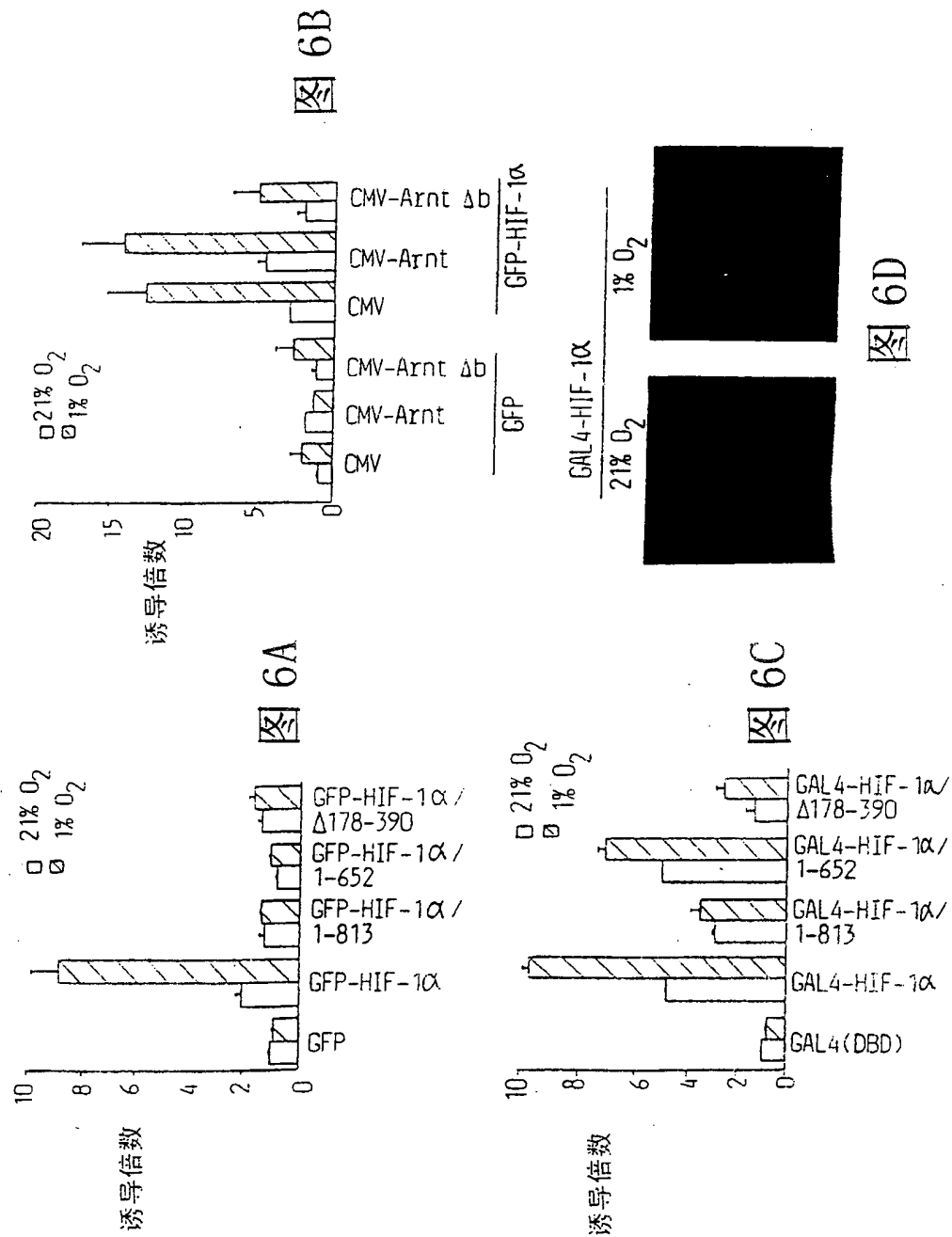
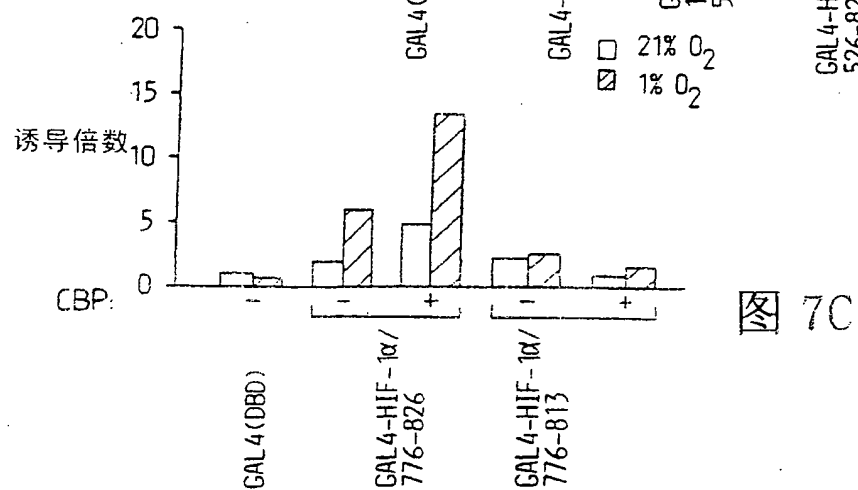
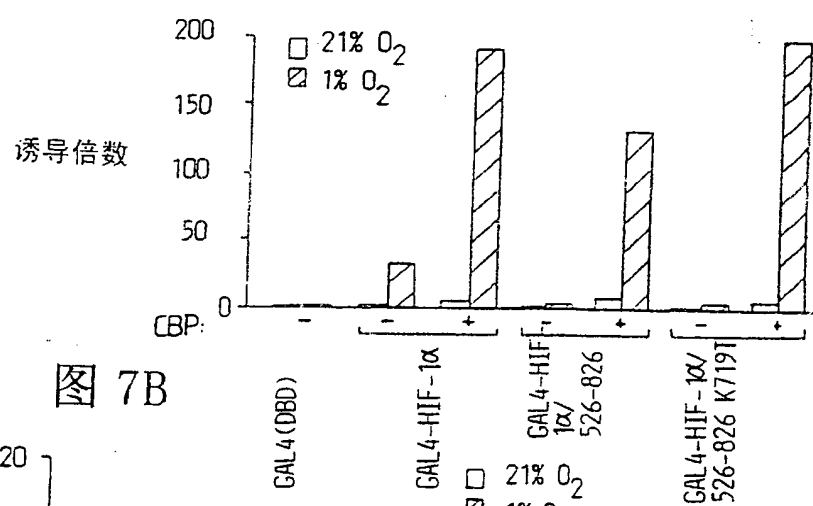
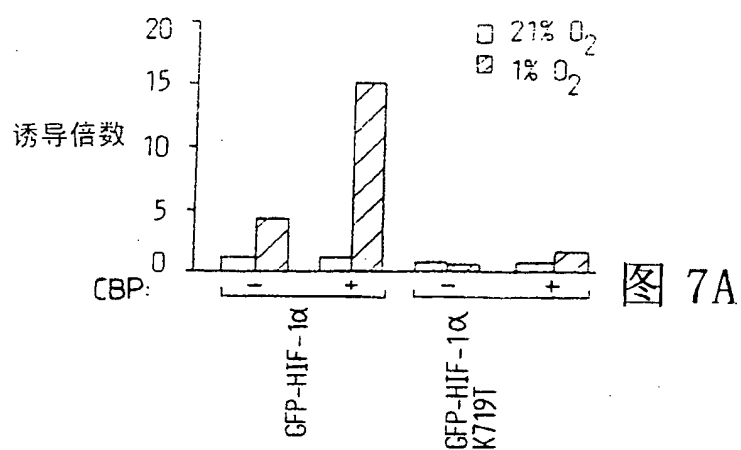
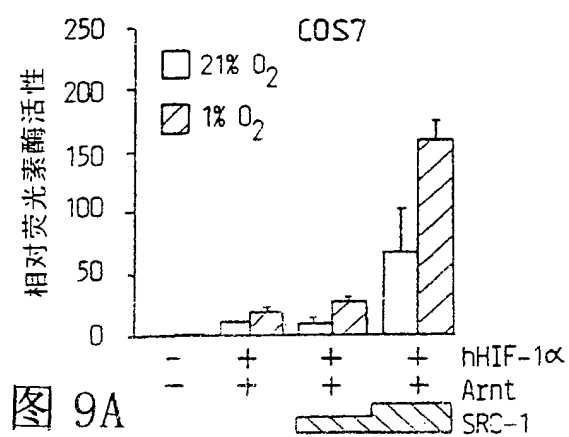
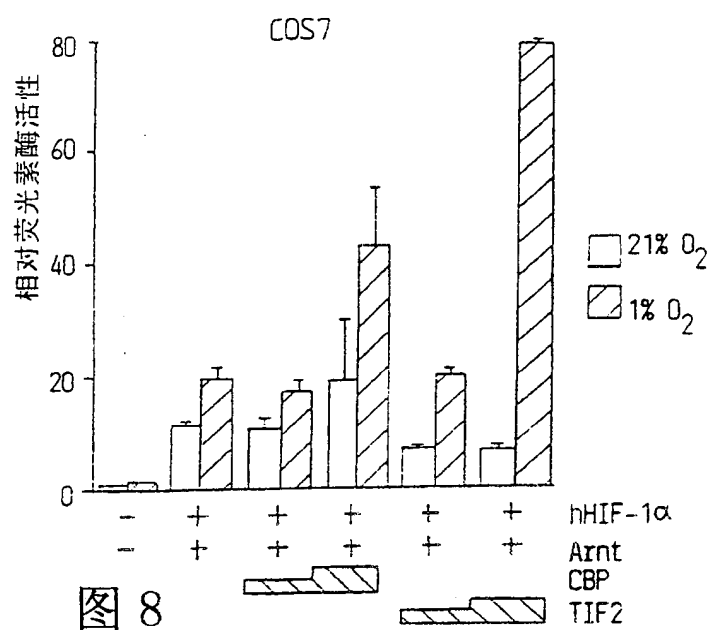


图 5B

10 μ m







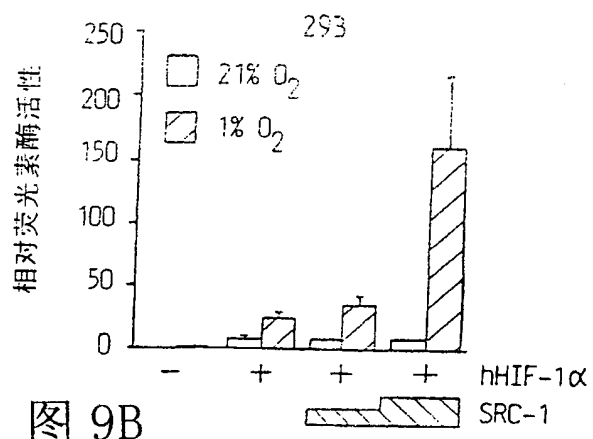


图 9B

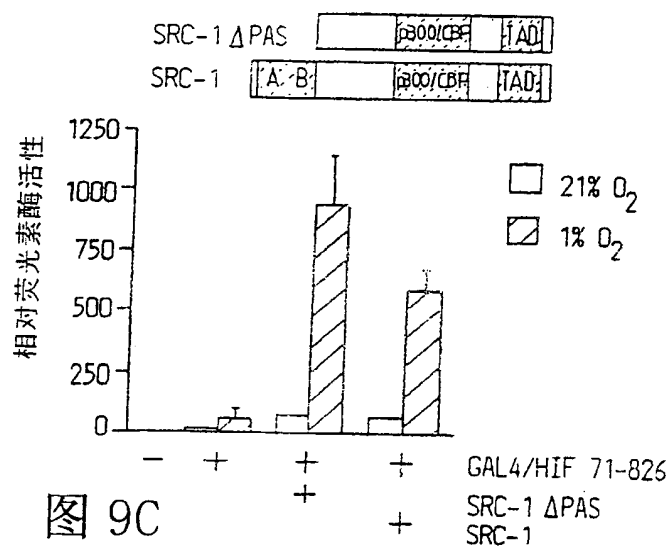


图 9C

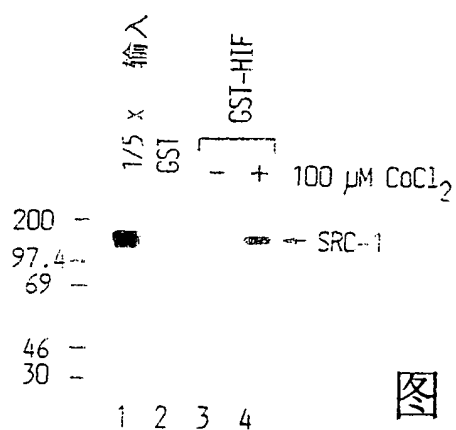
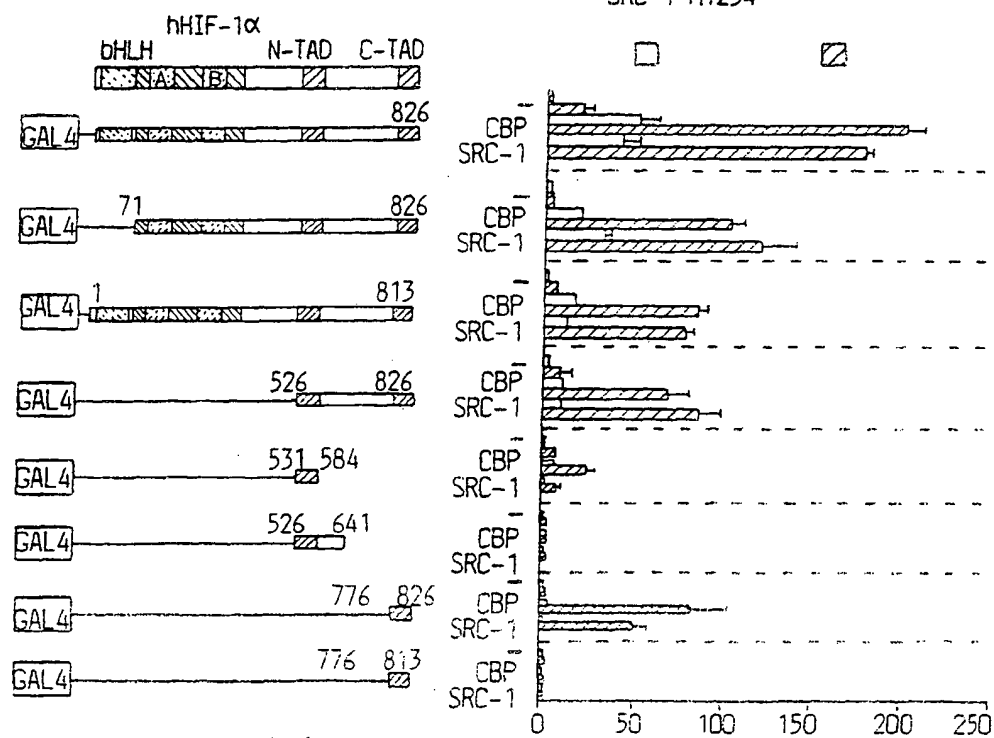
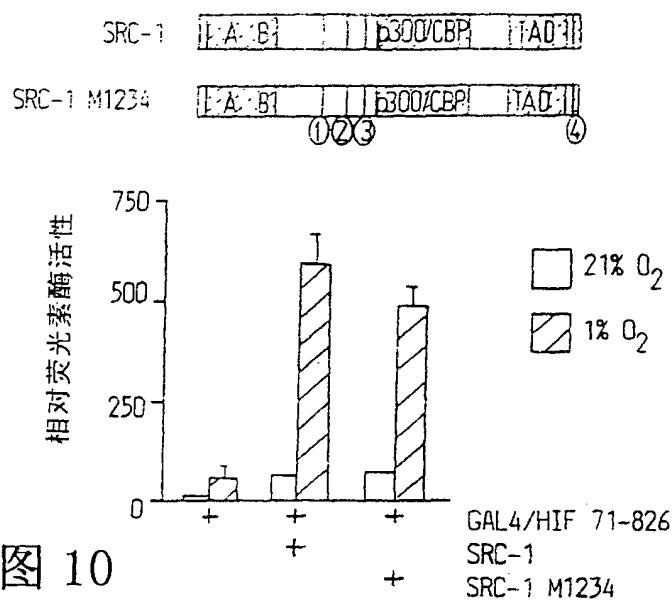
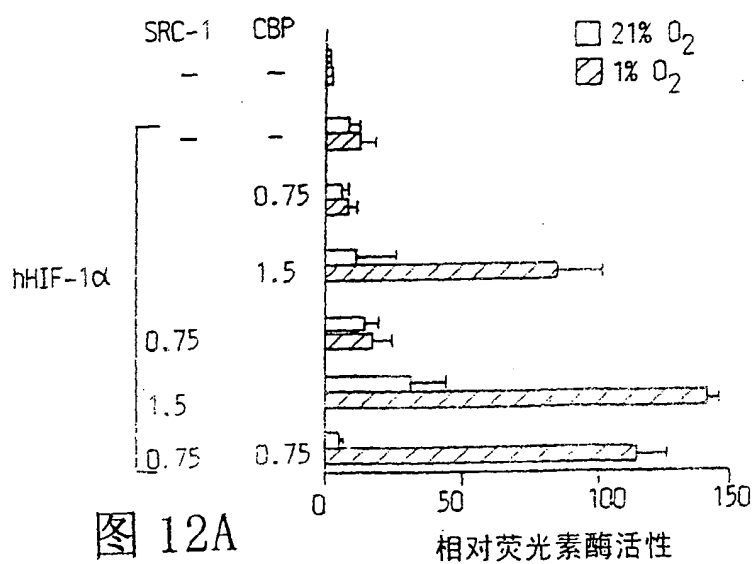
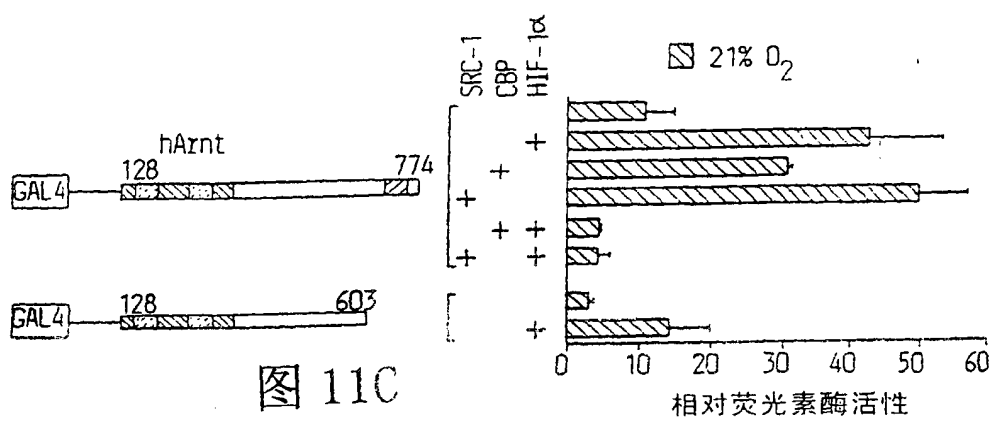
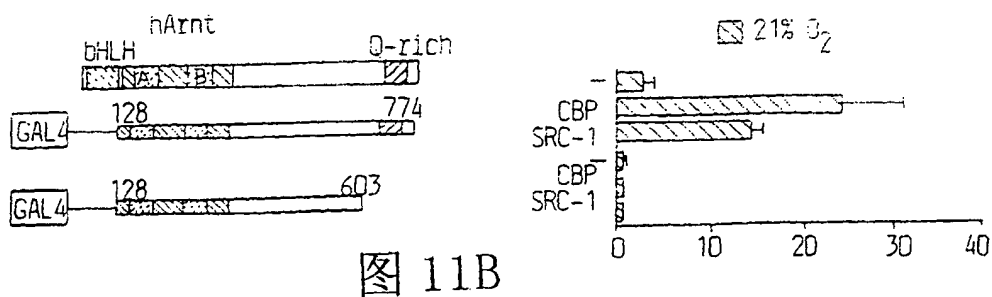


图 9D





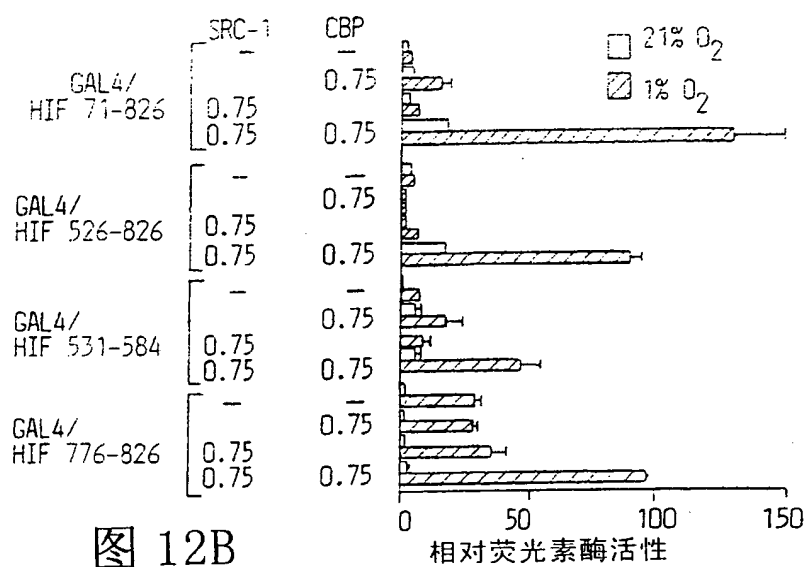


图 12B

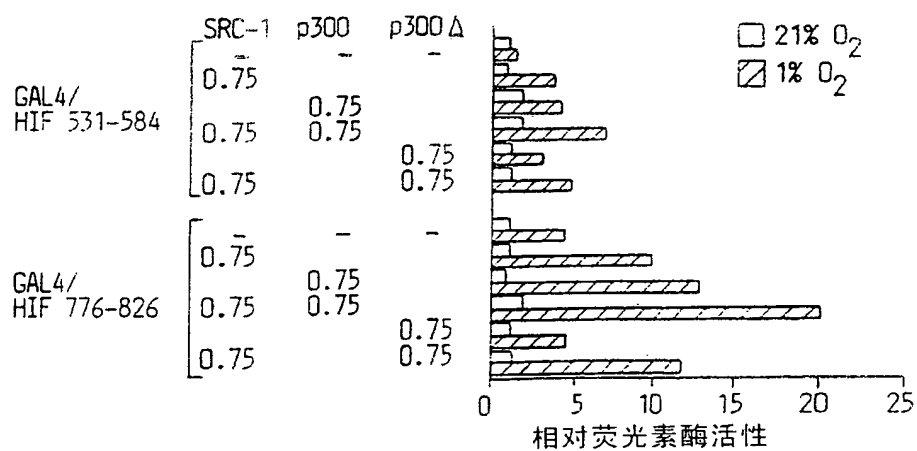
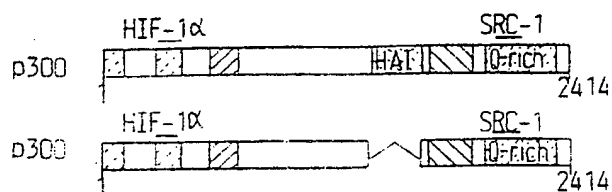


图 12C



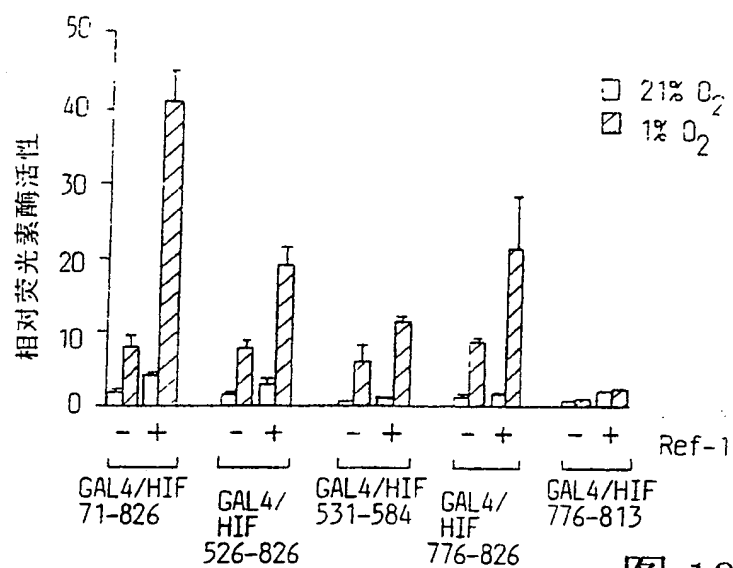


图 13A

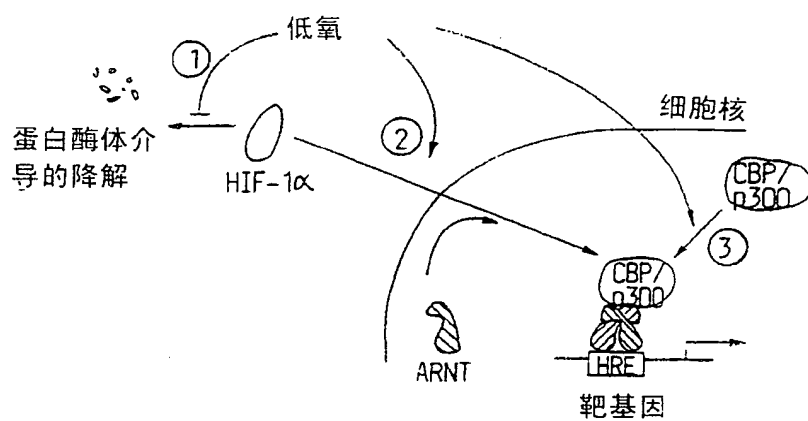


图 14

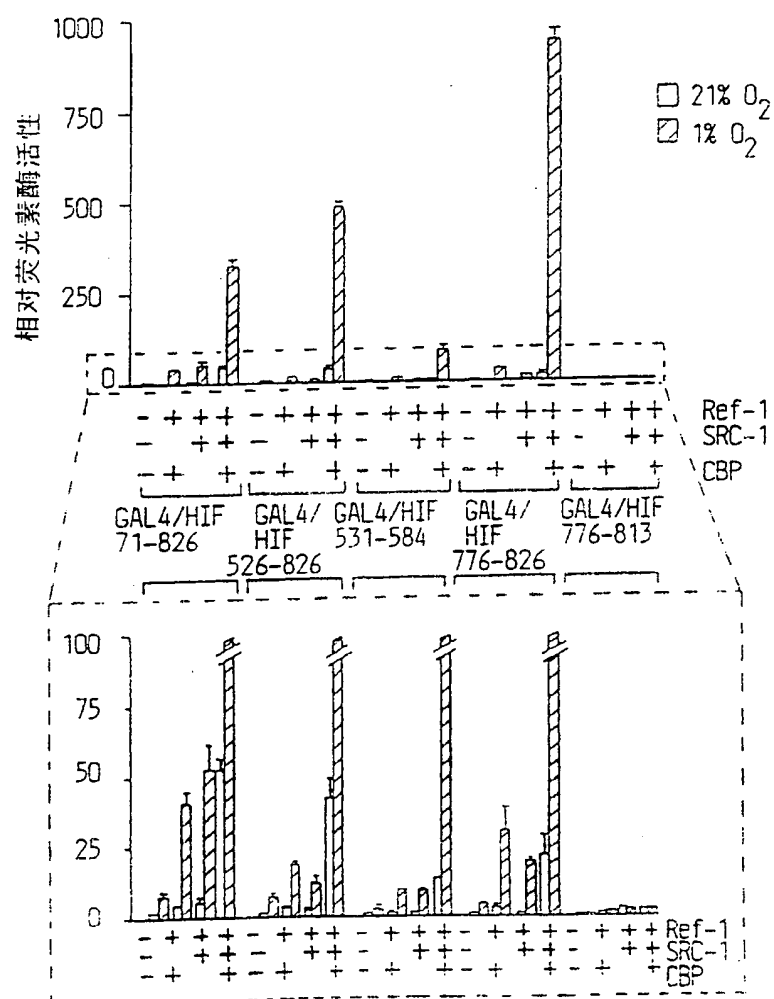


图 13B